

Solubilité en présence de sels neutres
et spécificité des hémoglobines sanguines

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Juin 1941

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

MARTHE MOUTTE

née le 24 août 1916 à Plan-de-Cuques (Bouches-du-Rhône)

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

Examineurs de la Thèse	{	MM. J. ROCHE, <i>Président.</i>	}	<i>Assesseurs.</i>
		M. NICLOUX, Prof. Facult. Méd. Strasbourg.		
		F. RIMATTEI, <i>Professeur.</i>		
		M. ARNOUX. <i>Agrégé.</i>		

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1941

FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
N^o

Solubilité en présence de sels neutres
et spécificité des hémoglobines sanguines

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Juin 1941

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

MARTHE MOUTTE

née le 24 août 1916 à Plan-de-Cuques (Bouches-du-Rhône)

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

Examineurs de la Thèse	{	M. M. J. ROCHE, <i>Président.</i>	{	<i>Assesseurs.</i>
		M. NICLOUX, Prof. Facult. Méd. Strasbourg.		
		F. RIMATTEI, <i>Professeur.</i>		
		M. ARNOUX, <i>Agrégé.</i>		

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1941

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : A. CHEVALLIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

*Professeurs honoraire*s : MOITESSIER, CASSOUTE

*Chargés de Cours honoraire*s : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} GEORGE

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses.....	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	OLMER
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	AUBARET
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	GABRIEL
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie interne	MONGES
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	COTTE
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique	GAUJOUX
Stomatologie (Professeur sans chaire)	BELTRAMI
Physiologie (Professeur sans chaire)	MALMÉJAC

Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI	MM. SAUTET	MM. ARNOUX
JAYLE	BALANSARD	DELPHAUT
MOIROUD	BRAHIC	IMBERT
CARCASSONNE	FIGARELLA	AUDIER
BERTHIER	SALMON	CHOSSON
POINSO	PAILLAS	DOR
DUBOULOZ		RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Médecine du travail.....	PERIOT
Psychiatrie.....	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT
Chimie biologique	DUMAZERT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549014_0030

A MA GRAND'MÈRE.

A MES TRÈS CHERS PARENTS.

A MA TANTE.

A MON MAÎTRE, MONSIEUR LE PROFESSEUR J. ROCHE.

A MONSIEUR LE DOCTEUR Y. DERRIEN.

A MON JURY DE THÈSE.

A TOUS MES AMIS.

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

INTRODUCTION.

I. — <i>Structure générale et principales propriétés des hémoglobines</i>	11
A. Classification des pigments respiratoires...	11
B. Constitution générale des hémoglobines....	13
C. Propriétés générales des hémoglobines.....	15
1. Combinaisons avec les gaz.....	15
2. Spectre	15
3. Poids moléculaire	16
4. Combinaison avec les acides et les bases. Pouvoir tampon des hémoglobines....	16
5. Point isoélectrique	17
II. -- <i>Spécificité des hémoglobines</i>	17
A. Ses principales manifestations.....	17
1. Analyse élémentaire et composition en acides aminés	18
2. Variété des formes cristallines.....	18
3. Caractères spectraux spécifiques et affi- nité pour les gaz	19
4. Solubilité dans l'eau ou les solutions salines	20
B. Ses bases	20
III. - <i>Objet du travail</i>	21

RECHERCHES PERSONNELLES.

I. — <i>Généralités sur l'étude de la solubilité des protéines dans des milieux de concentration croissante en sels neutres</i>	23
1. Cas des protéines pures.....	23
2. Cas des mélanges	32
II. — <i>Travaux antérieurs sur la solubilité des hémoglobines dans des milieux de concentration croissante en sels neutres</i>	37

1. Recherches sur la préparation des hémoglobines	37
2. Recherches sur la détermination des constantes de solubilité des hémoglobines	38
III. — <i>Recherches sur la préparation d'hémoglobines pures</i>	41
1. Obtention d'un hémolysat globulaire..	42
2. Techniques de purification	42
a) Cas des hémoglobines ayant une aptitude relativement faible à la cristallisation	43
b) Cas des hémoglobines très facilement cristallisables	45
IV. — <i>Etablissement des courbes de relargage de redissolution de cristaux</i>	46
Dosage de l'azote protéique en présence des sels ammoniacaux (Méthode de A. ROCHE et F. MARQUET)	48
V. — <i>Résultats expérimentaux</i>	49
Tableaux I à XXV	50
Figures 2 à 6	63
Examen d'ensemble des résultats	67
Figures récapitulatives 7 à 9.....	68
Tableaux des valeurs de K_s' et β'	69
VI. — <i>Discussion des résultats et conclusions</i>	71
1. Dissolution des cristaux et relargage..	71
2. Valeur relative des constantes β' et K_s' pour la caractérisation des protéines.	72
3. Solubilité en présence des sels neutres et spécificité des hémoglobines sanguines	73
4. Existence probable de plusieurs hémoglobines dans un même sang	75
RÉSUMÉ	77
BIBLIOGRAPHIE	79

INTRODUCTION.

I. — STRUCTURE GÉNÉRALE ET PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES HÉMOGLOBINES.

La vie des êtres aérobies est liée à un apport constant d'oxygène dans les cellules. La diffusion de ce gaz de l'air dans le protoplasme se fait directement chez certains animaux inférieurs. Mais, lorsqu'on s'élève dans l'échelle animale, l'organisation se complique ; des intermédiaires apparaissent alors qui fixent l'oxygène dans le milieu extérieur et le distribuent aux tissus. Ces transporteurs sont les pigments respiratoires, chromoprotéides que l'on rencontre dans le sang des Vertébrés, dans le liquide cœlomique et l'hémolymphe de certains Invertébrés. Ils sont constitués par l'union d'une protéine incolore avec un groupement prosthétique coloré contenant un métal, fer ou cuivre. Leur structure, leurs propriétés et leur spécificité ont retenu l'attention des physiologistes et des biochimistes.

A. — Classification des pigments respiratoires.

On en distingue quatre types :

les *hémoglobines*, pigments sanguins et musculaires rouges des vertébrés,

les *crûorines* comprenant : les chlorocrûorines, pigments sanguins verts de certains Annélides, et les érythrocrûorines, pigments sanguins rouges de nombreux Invertébrés,

les *hémocyanines*, pigments sanguins bleus des Mollusques et des Crustacés,

les *hémérythrine*s, pigments sanguins et cœlomiques bruns de certains Sipunculiens.

Les hémocyanines contiennent du cuivre et les autres chromoprotéides respiratoires renferment du fer. Tous ont une très grande affinité pour l'oxygène, avec lequel ils donnent des combinaisons prenant naissance quand la pression de ce gaz dans le milieu est suffisante et facilement dissociables quand la pression du gaz devient trop faible. Il existe un rapport quantitatif constant entre la quantité d'oxygène fixée et celle de métal contenue dans le pigment. Dans toutes les hémoglobines (BARCROFT, PETERS) et dans la chlorocruorine du Spirographe (FOX) un atome-gramme de fer fixe une molécule-gramme d'oxygène. Dans les hémérythrine trois atomes-grammes de fer se combinent à une molécule-gramme d'oxygène (FLORKIN). Dans les hémocyanines un atome-gramme de ce gaz s'unit à un atome-gramme de cuivre (DHÉRE, REDFIELD).

La connaissance de ce rapport quantitatif constant a permis de déterminer la capacité maxima de combinaison de l'oxygène pour un pigment, connaissant sa teneur en métal.

L'oxyde de carbone s'unit également à ces corps et sa combinaison s'opère aussi suivant un rapport constant entre la quantité de gaz fixée et la quantité de métal des hémoglobines (NICLOUX) et des hémocyanines (CONANT et FIESER). Pour les autres types de chromoprotéides des documents du même ordre n'ont pas été établis.

Mais si le rapport est constant dans l'un et l'autre cas, l'affinité des pigments pour les deux gaz est différente (NICLOUX, HALDANE, BOHR, BARCROFT). Les hémoglobines et les chlorocruorines ont pour l'oxyde de carbone une affinité plus grande que pour l'oxygène. Leurs combinaisons oxycarbonées ne sont facilement décomposées que par l'oxygène pur (NICLOUX). Au contraire les hémocyanines ont plus d'affinité pour l'oxygène que pour l'oxyde de carbone.

Les pigments respiratoires sont donc des chromoprotéides contenant du fer ou du cuivre. Ils peuvent se combiner réversiblement à l'oxygène ou à l'oxyde de carbone, et cela proportionnellement à leur teneur en métal.

Nous allons envisager la constitution générale et les propriétés des hémoglobines, à l'exclusion des autres pigments hématiniques (*).

(*) Rappelons que les érythrocrurines (RAY LANKESTER, SVEDBERG, VLÈS), sont des chromoprotéides contenant la même hématine que les hémoglobines, mais un constituant protéique d'un type voisin de celui des chlorocruorines (ROCHE), dont l'hématine diffère de celles des hémoglobines.

B. — Constitution générale des hémoglobines.

Les hémoglobines existent sous forme de nombreuses variétés ayant des propriétés générales communes et des caractères spécifiques variables suivant l'espèce animale dont elles proviennent.

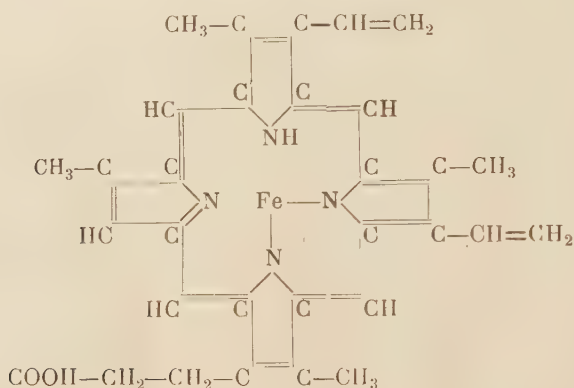
Toutes les hémoglobines ont été obtenues à l'état cristallisé et on a effectué leur analyse élémentaire. Les résultats de celle-ci démontrent la présence du fer dans leur molécule en quantité toujours identique, soit 0,33 p. 100 Fe (TIMAR). Leur constitution a été établie après des recherches effectuées sur leurs produits de dégradation. En effet, de nombreux réactifs chimiques (acides et bases) ou biologiques (enzymes, sucs digestifs) agissant dans certaines conditions permettent de dédoubler les hémoglobines en un protéide incolore, la globine, et un groupement prosthétique coloré, l'hématine ordinaire ou protohématine, contenant la totalité du métal du pigment.

Les acides et les bases à froid, à une concentration inférieure à 10 p. 100, transforment d'abord les hémoglobines en des corps inaptes à fixer l'oxygène et l'oxyde de carbone, les méthémoglobines. Le fer est à l'état trivalent dans ces composés, tandis qu'il est à l'état divalent dans les hémoglobines. Le deuxième temps de cette dégradation sépare l'hématine de la globine. Les hématines sont les seuls produits colorés prenant naissance au cours de la dégradation des hémoglobines. On peut facilement les isoler sous forme de chlorhydrates ou hémines.

A la suite des recherches d'H. FISCHER ayant abouti à la synthèse de certaines d'entre elles, leur structure a été définitivement établie. Elles dérivent du noyau tétrapyrrolique de la porphine, dans lequel certains atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupements alcoyle ou acyle pour donner des corps appelés porphyrines. Ces porphyrines peuvent fixer des métaux lourds et donner des métalloporphyrines. Les combinaisons des porphyrines avec le fer sont appelées *hèmes* lorsque le métal est à l'état divalent (Fe II), *hématines* lorsque ce dernier est trivalent (Fe III).

L'hématine de l'hémoglobine dérive de la protoporphyrine. Son hème répond à la formule de la 1.2.5.8.tétraméthyl, 2.4.divinylporphine, 6.7propanoïque ; on l'appelle le protohème (H. FISCHER).

Toutes les hémoglobines sanguines et musculaires des animaux supérieurs contiennent le protohème. De même les érythrocrurines (hémoglobines d'Invertébrés), tandis que les chlorocrurines renferment une hématine particulière, la chlorocruohématine (H. FISCHER et C. von SEEMANN). On admet que les hémoglobines contiennent un hème, forme réduite, à fer divalent (Fe II) de l'hématine, tandis que les méthémoglobines contiennent cette dernière, à fer trivalent (Fe III).



Protohème des hémoglobines (H. FISCHER)



Les porphyrines, très répandues dans la nature, constituent le noyau fondamental de nombreux pigments animaux et végétaux : les cytochromes, les hémoglobines sanguines et musculaires, la peroxydase, la catalase. Elles peuvent être obtenues cristallisées. Elles ont un fort pouvoir colorant. Les rayons ultra-violetts leur donnent une fluorescence rouge, et leur spectre permet de les identifier. Tous ces dérivés participent à des oxydations cellulaires. On comprendra dès lors que les hémoglobines possèdent une action peroxydasique nette due au groupement prosthétique.

Le second constituant libéré sous l'action des acides et des bases est une protéine incolore, ou globine, dépourvue de métal. Quelle que soit l'hémoglobine étudiée l'hématine obtenue est toujours la même. Au contraire, la partie protéique a une composition variable. Il semble que la spécificité des pigments soit en rapport avec la nature de cette protéine.

Une expérience réalisée en 1893 par BERTIN-SANS et MOITESIER [1], reprise depuis par ANSON et MIRSKY, HILL et HOLDEN, prouve de façon directe que les hémoglobines résultent de

l'union d'une globine et d'une hématine. Le mélange d'une solution neutre ou faiblement alcaline de globine et de protohématine régénère une méthémoglobine. La réduction de cette méthémoglobine conduit à une hémoglobine. Cette expérience a été étendue par J. ROCHE aux myoglobines.

Quand la globine est dénaturée, elle s'unit à l'hématine pour former la cathémoglobine. La globine est la seule protéine apte à se combiner à l'hématine pour donner naissance à une hémoglobine.

Après ce bref rappel de la structure des hémoglobines nous allons envisager leurs propriétés : propriétés générales rattachées au groupement prosthétique, propriétés particulières qui sont les manifestations de la spécificité et semblent en rapport avec la partie protéique.

C. — Propriétés générales des hémoglobines.

Les plus caractéristiques sont leur aptitude de se combiner à l'oxygène et à l'oxyde de carbone, et le spectre d'absorption de leur dérivé oxygéné ou oxycarboné.

1. **Combinaison avec les gaz.** — Il existe un rapport constant entre le fer hématinique du pigment et sa capacité de fixation vis-à-vis de l'oxygène (Fe/O_2) et de l'oxyde de carbone (Fe/CO) (HALDANE, PETERS, NICLOUX). La propriété respiratoire du pigment est donc en rapport avec le groupement prosthétique de celui-ci. Le fait qu'un rapport identique caractérise tous les pigments hématiniques démontre le rôle joué par le constituant métallique dans ces combinaisons.

La partie protéique du pigment participe cependant aux réactions de combinaison avec les gaz. Mais elle n'intervient pas dans l'existence même de ces réactions. Une autre preuve du rôle du métal est donnée par le fait que les méthémoglobines sont incapables au transport de l'oxygène et de l'oxyde de carbone. Elles ne diffèrent des hémoglobines que par le passage du fer de l'état divalent à l'état trivalent (CONANT). Une modification dans l'état du groupement prosthétique enlève donc au pigment sa propriété de transporter l'oxygène et en modifie le spectre.

2. **Spectre.** — Dans le spectre bien connu des hémoglobines on peut mettre en évidence le rôle dévolu au groupement prosthétique. Le spectre dans l'ultra-violet d'une globine, dif-

fère de celui de l'hématine correspondante par la bande caractéristique des constituants cycliques (tyrosine, phényl alanine) dont le maximum est voisin de 2750 Å (DHÉRÈ, VLÈS). En dehors de celle-ci, les autres bandes existent dans les deux catégories de corps.

Les expériences de synthèse partielle des hémoglobines avec diverses hématines sont caractéristiques. La protohématine extraite du sang, du muscle, s'unit, après réduction, à une globine en régénérant une hémoglobine dont les combinaisons carbonée et oxycarbonée ont le spectre du pigment dont provient la globine (ROCHE). On peut donc considérer que les caractères généraux envisagés, affinité pour les gaz, et spectre, sont dûs au groupement prosthétique.

3. Poids moléculaire. — Le poids moléculaire des chromoprotéides atteint, comme celui des autres protéines, un ordre de grandeur beaucoup plus élevé que celui des composés minéraux ou organiques usuels.

Le poids moléculaire des hémoglobines, calculé d'après la teneur en fer (0,33 p. 100) est égal à 17.000 (HÜFFNER et GANSER). Des méthodes physicochimiques de détermination du poids moléculaire, basées sur les propriétés générales des colloïdes ont permis de se rendre compte que dans le cas des hémoglobines des Vertébrés supérieurs, le poids moléculaire du chromoprotéide était égal à 68.000 pour les pigments sanguins (ADAIR, SVEDBERG) et à 17.000 pour les pigments musculaires (PEDERSEN, J. ROCHE et H. VIEIL).

4. — Combinaison avec les acides et les bases. Pouvoir tampon des hémoglobines. — Les pigments respiratoires sont des protéides, donc des ampholytes. Ils peuvent se combiner aux acides ou aux bases suivant le pH du milieu. Le mécanisme est alors réversible dans une certaine marge de pH appelée « région de pH de stabilité ». Pour les hémoglobines elle est comprise entre 5,5 et 8,5 (SVEDBERG). L'intérêt biologique de ce phénomène dans le cas de l'hémoglobine est rattaché d'une part au transport de CO_2 et des déchets acides du métabolisme, d'autre part au transport des bases du sang. Le point isoélectrique varie selon l'état d'oxygénation du pigment. Au point isoélectrique le chromoprotéide fixe les mêmes quantités d'acides et de bases. Le pH dans les hématies est toujours plus élevé que le point isoélectrique de l'hémoglobine. Cette

dernière se comporte donc comme un acide existant à l'état de sels de base (Van SLYKE).

Elle agit au pH du sang comme un acide polyvalent. Elle a un pouvoir tampon tel que, pour obtenir une variation de pH d'une unité, on doit ajouter 2,5 équivalents de base ou d'acide à la quantité de pigment contenant un atome-gramme de fer.

Ce phénomène a été constaté non seulement pour les hémoglobines, mais encore pour les pigments respiratoires des autres groupes (J. ROCHE).

5. **Point isoélectrique.** — Les hémoglobines sont des colloïdes amphotères. Elles ont des fonctions acides et basiques plus ou moins dissociées suivant le pH du milieu. Quand les deux fonctions sont également dissociées, le pH mesuré est celui du point isoélectrique (pHi).

Ces valeurs sont importantes dans l'étude des propriétés et du rôle respiratoire des hémoglobines. Van SLYKE et SVEDBERG ont montré que la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine, modifie le point isoélectrique du pigment sanguin.

Les hémoglobines vraies ont un pH voisin de la neutralité (6,7 à 7,2). Dans le cas du Cheval, on a une valeur de 6,78. Le même pigment oxygéné a un pHi de 6,65. Le méthémoglobine a un pHi de 7,0, celui de la carboxyhémoglobine étant identique à celui de l'oxyhémoglobine (6,8).

II. — SPÉCIFICITÉ DES HÉMOGLOBINES.

A. — Ses manifestations.

Les biochimistes ont longtemps considéré que le sang, les muscles rouges, ou le liquide cœlomique des divers animaux, contiennent le même pigment respiratoire. De nombreux travaux ont permis d'établir qu'il existe non pas une hémoglobine, mais une grande variété d'hémoglobines dont la présence est particulière à une espèce, parfois même à un individu.

Les pigments d'un même groupe ont des caractères communs, mais à des degrés divers. Ces différences quantitatives objectivent la notion de spécificité des hémoglobines (*).

(*) Nous nous limiterons, dans ce travail, à la spécificité des hémoglobines vraies, écartant totalement l'étude des érythrocrurines.

1. *Analyse élémentaire et composition en acides aminés.* — L'analyse élémentaire (teneur en C, H, N, S, Fe) entreprise sur diverses hémoglobines a montré qu'il existe entre elles des différences (TIMAR, ROCHE). La teneur en azote est peu variable (de 16,6 à 16,8 p. 100). Mais la teneur en soufre est moins constante (de 0,50 à 0,70 p. 100). Quant au taux du fer, il varie très peu autour de 0,33 p. 100.

Ce fait prouve la constance de la teneur en hématine des pigments étudiés.

Ces résultats témoignent aussi de la diversité de constitution de la partie protéique des hémoglobines étudiées.

La composition des hémoglobines en acides aminés est beaucoup plus significative à cet égard. J. ROCHE et G. JEAN ont étudié celle d'hémoglobines provenant d'animaux d'espèces différentes et établi le rapport arginine/soufre dans les mêmes corps. Le rapport varie de 0,89 pour l'homme à 1,29 pour le Cheval. On peut même entrevoir des variations intra spécifiques de composition dans les hémoglobines provenant d'animaux d'espèces différentes par son étude et par celle du spectre ultraviolet des globines d'animaux d'une même espèce (ROCHE, DUBOULOZ et JEAN).

2. *Variété des formes cristallines.* — De nombreux travaux ont établi la variété de formes cristallines de diverses hémoglobines (REICHERT et BROWN, AMANTEA). La cristallisation de ces pigments s'effectue avec plus ou moins de facilité. Mais ce polymorphisme ne doit pas être considéré comme un caractère très fidèle. Les formes obtenues dépendent en effet parfois des conditions dans lesquelles la cristallisation a été conduite.

Des différences dans la forme cristalline des hémoglobines de l'homme adulte et du nouveau-né ont été notées (HAUROWITZ) et même dans celle des chromoprotéides de sujets de races différentes (AMANTEA). Mais il est difficile d'apprécier la valeur de ces résultats car l'hémoglobine de l'adulte cristallise très difficilement et on se trouve peut-être en présence de formes cristallines aberrantes.

En général, dans l'étude de la spécificité d'une protéine, les biologistes se réfèrent à l'immunologie. Dans le cas des hémoglobines, au contraire, c'est à la biochimie seule qu'il faut avoir recours car ce pigment est dépourvu de pouvoir antigène (BRUYNOGHE). L'étude des caractères spécifiques de ces chro-

moprotéides entre dans le cadre des sciences physico-chimiques.

3. *Caractères spectraux et affinité pour les gaz spécifiques.*

L'étude du spectre d'absorption des dérivés oxygénés et oxycarbonés des hémoglobines est caractéristique à cet égard. Le spectre à deux bandes de ces dérivés présente des différences selon l'espèce animale. BARCROFT, ANSON, MIRSKY et OINUMA constatèrent que l'axe de la bande α des dérivés oxygénés et oxycarbonés d'un même pigment, occupe une position différente selon l'espèce. De plus, l'intervalle séparant l'axe des bandes α de ces deux dérivés, ou « span » (D), présente une valeur (en unités Angström) propre à chaque espèce.

Par ailleurs, les hémoglobines des espèces différentes n'ont pas la même affinité pour l'oxygène et l'oxyde de carbone (BARCROFT).

Dans la relation : $\text{HbO}_2 + \text{CO} \rightleftharpoons \text{HbCO} + \text{O}_2$ la valeur de la constante d'équilibre $K = \frac{[\text{Hb CO}] \times [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2] \times [\text{CO}]}$ est propre à chaque hémoglobine. En outre les variations de la différence, mesurées en unités Angström, entre les axes des bandes α des dérivés oxygénés et oxycarbonés, sont parallèles aux variations de K.

La relation $\log K = 0,05 \times D$ permet, dans une certaine marge de valeurs, de relier l'affinité des hémoglobines pour les gaz à leur spectre d'absorption. Ces observations ont été étendues par J. ROCHE, aux hémoglobines musculaires. L'affinité pour l'oxyde de carbone est beaucoup plus faible et D beaucoup plus petit que dans le cas des hémoglobines sanguines (THEORELL, ROCHE), en sorte que la relation de BARCROFT, ANSON, MIRSKY et OINUMA se vérifie pour les unes et les autres.

L'existence de cette spécificité a été mise en évidence par l'étude cinétique du dédoublement des hémoglobines en deux constituants (Réaction de Von KRÜGER). Cette étude a montré des variations dans la résistance des différents pigments à l'action des bases (HAUROWITZ).

Dans la plupart des cas, l'expérience a montré que les propriétés physico-chimiques des transporteurs d'oxygène portent la marque de la spécificité, plus encore que la fonction respiratoire, dont l'existence tient au groupement prosthétique.

4. *Solubilité dans l'eau ou les solutions salines.* — Un autre fait illustre la spécificité des hémoglobines.

HEIDELBERGER et LANDSTEINER [9] ; GREEN, COHN et BLANCHARD [8] ont montré les différences de solubilité des hémoglobines sanguines dans l'eau ou les solutions salines concentrées, mais leurs travaux sont peu étendus et nous reviendrons plus loin sur ce caractère particulier des hémoglobines auquel est consacré notre travail.

B. — Bases de la Spécificité.

Ainsi, les manifestations de la spécificité sont multiples. Depuis qu'on a prouvé l'identité des hématines dans les hémoglobines sanguines et musculaires des Vertébrés et des Invertébrés, on rapporte au constituant protéique seul l'individualité du pigment dans une espèce déterminée. De nouvelles études entreprises dans la voie de la spécificité permettent d'asseoir cette affirmation sur des bases précises.

La combinaison de la globine sanguine à la protohématine régénère une hémoglobine identique à celle d'où provenait la globine. De même, la protohématine combinée à la globine musculaire régénère l'hémoglobine musculaire. Une expérience réalisée par J. ROCHE sur la protohématine et les globines sanguine et musculaire de Cheval, dont voici les résultats, est significative à cet égard.

Hémoglobine de cheval		Axe de la bande (unités Angström) dans		
		HbO ₂	HbCO	D
Musculaire..	1) dans l'extrait de cœur perfusé.....	5,802	5,769	32
	2) de synthèse (protohématine + globine musculaire).....	5,800	5,768	33
Sanguine...	1) dans le sang dilué...	5,771	5,709	62
	2) de synthèse (protohématine + globine sanguine).....	5,769	5,707	69

De nouveaux arguments peuvent être fournis en faveur de la théorie qui vient d'être exposée. Ils sont tirés des résultats donnés par l'étude de la composition et de la structure du protéide contenu dans le pigment.

Les diverses globines des Mammifères ont une composition en acides aminés et une teneur en soufre variables.

On ne sait pas, à l'heure actuelle, si la spécificité des hémoglobines provient de différences dans la composition ou de différences dans l'organisation de la molécule protidique. Cependant les variations de la teneur en acides aminés et celles du rapport : arginine/soufre sont telles qu'elles mettent en évidence la diversité des globines dans les pigments considérés. Les variations du spectre ultra-violet (ROCHE, DUBOULOZ et JEAN) sont à rapporter à la constitution des globines.

La spécificité de ces chromoprotéides est donc manifeste. Mais ses bases sont encore mal connues. Les manifestations individuelles sont peu nombreuses. On peut se demander aussi si les résultats observés ne sont pas dûs aux conditions d'expérience.

Cependant, des différences dans la forme cristalline, le point isoélectrique, le spectre d'absorption, la solubilité dans les solutions salines concentrées, nous sont apparues très nettement. Chez un même sujet on a observé des variations notables. Il semble dès lors que la notion de spécificité doive s'étendre non seulement à l'espèce, mais à l'individu.

III. — OBJET DU TRAVAIL.

La plupart des manifestations de la spécificité des hémoglobines pures se prêtent mal à des mesures précises en sorte que si la notion de spécificité ne peut être aujourd'hui mise en discussion, il est difficile de l'exprimer quantitativement de manière systématique dans le cas des diverses hémoglobines. Nous avons pensé qu'il y avait lieu de rechercher s'il existe des différences dans certaines constantes physicochimiques des hémoglobines sanguines, afin de disposer, pour des discussions ultérieures, de données quantitatives sur la spécificité de ces chromoprotéides. On pouvait espérer mettre en évidence par ce moyen des différences ou des analogies précises entre certaines hémoglobines, et, par là, ouvrir la voie à de nouvelles recherches.

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la solubilité des hémoglobines dans l'eau et dans les solutions salines. Nous avons estimé qu'il y avait lieu de les étendre et le but de notre travail est d'apporter une contribution à l'étude de la solubilité des hémoglobines sanguines dans des milieux de concentration croissante en sels neutres, sur les bases théoriques et techniques posées par SÖRENSEN, E. J. COHN, BONOT.

La première partie est consacrée à l'établissement d'un contrôle de la pureté des hémoglobines préparées par les diverses méthodes classiques et à la mise au point d'une technique permettant d'obtenir des hémoglobines pures.

La seconde partie porte sur l'établissement des constantes de l'équation d'E. J. COHN appliquée au relargage de diverses hémoglobines en solution et à la solubilité des mêmes corps cristallisés.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Le but de notre travail est d'apporter une contribution à la connaissance de la spécificité des hémoglobines sanguines par l'étude de leurs caractères de solubilité dans des milieux de concentration croissante en sels neutres.

Après un résumé des travaux antérieurs sur la solubilité des protéines dans les sels neutres, nous envisagerons les diverses méthodes que nous avons mises en œuvre pour obtenir des protéines pures et nous discuterons ensuite les données obtenues sur celles-ci.

I. — GÉNÉRALITÉS SUR L'ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ DES PROTÉINES DANS DES MILIEUX DE CONCENTRATION CROISSANTE EN SELS NEUTRES.

1. — Cas des protéine pures.

En ce qui concerne les bases théoriques et expérimentales de l'étude des caractères de solubilité des protéines dans les solutions salines concentrées, il n'y a pas lieu de revenir sur l'excellent exposé qu'en a fait A. BONOT [2]. Nous nous bornons à le reproduire.

« Les travaux qui concernent la solubilité des protéides dans les solutions salines se rapportent en grande partie au phénomène général de la précipitation par les sels (salting out).

Dès 1850, des chercheurs ont employé la précipitation saline des protéides : A. BERNARD en France, PANUM, au Danemark, puis VIRCHOW en Allemagne. En 1887, HOFMEISTER montre que le phénomène dépend du caractère du sel neutre autant que de la nature du protéide. En 1905 MELLANBY montre que « la dissolution d'une globuline est due à des forces exercées par les ions libres du sel neutre, la puissance

d'un ion étant directement proportionnelle au carré de sa valence ». En 1913 CHICK et MARTIN déterminent expérimentalement la solubilité de l'ovalbumine dans des solutions concentrées de sulfate d'ammonium ; ces expériences ont été reprises en 1917 par SÖRENSEN et HOYRUP qui ont tenu compte de l'hydratation des précipités d'ovalbumine.

En 1923, dans leur théorie des électrolytes DEBYE et HÜCKEL font intervenir les forces électriques qui agissent entre les charges des ions et calculent les coefficients d'activité de ces ions. Poursuivant le développement de cette théorie, DEBYE et MAC AULAY étudient les effets des sels neutres sur les coefficients d'activité de non électrolytes et aboutissent pour des solutions concentrées à la relation :

$$\text{Log } f = K_s \cdot C_s$$

où K_s est une constante caractéristique au sel dans l'expression de laquelle interviennent le rayon moyen des ions, la somme des carrés de leurs valences, la constance diélectrique du solvant : l'eau ; C_s est la concentration moléculaire du sel neutre.

La même année, en se basant sur les résultats corrigés de CHICK et MARTIN et ceux de SÖRENSEN et HOYRUP, E. J. COHN formule une loi de la solubilité d'un protéide en solution saline concentrée :

$$\log S = \alpha m + \beta$$

où S est la solubilité du protéide en grammes par litre, m la concentration moléculaire du sel neutre, α une constante, le coefficient β une fonction de la concentration des ions hydrogène.

LINDERSTRÖM-LANG emploie une équation identique pour exprimer les effets des sels neutres sur le potentiel de l'électrode quinone-hydroquinone, il montre que le logarithme de la solubilité des acides faibles est inversement proportionnel à la concentration en sel neutre. En 1893, LETSCHENOW avait montré que la solubilité des gaz varie en fonction de la concentration saline suivant une exponentielle. COHN pense donc que l'action précipitante des sels neutres sur les protéides est un phénomène dû aux actions entre les ions du sel et les particules protéiques. Il voit dans les différences de grosseur qui existent entre les particules appartenant à des protéides différents une explication partielle du fait que ces protéides pré-

cipitent pour des concentrations salines très différentes, fait qui trouve application dans la séparation des protéïdes du sérum. Il rappelle la manière de voir formulée en 1917 par SÖRENSEN, d'après laquelle la solubilité d'un électrolyte monovalent serait une mesure du coefficient d'activité de ses ions :

$\gamma = \frac{a}{m}$. A température constante, l'activité en solution des ions de l'électrolyte a est fixé par l'activité dans le solide. La valeur du coefficient d'activité est donc inversement proportionnelle à la solubilité m . Ce raisonnement, généralisé depuis, justifie théoriquement l'application de COHN.

La vérification expérimentale de cette loi a été tentée dans plusieurs travaux. SÖRENSEN et ses collaborateurs ont montré que pour l'ovalbumine, les résultats expérimentaux pouvaient être représentés par la formule suivante dérivée de celle de COHN :

$$\log s = -0,22 \cdot S + 5,41 + 1,7 (\text{pH} - 4,90)$$

où S désigne le poids de sulfate d'ammoniaque contenu dans la solution pour 100 grammes d'eau libre, s le poids d'hydrate d'albumine dissoute p. 100 d'eau libre ».

La formule initiale de COHN a, par la suite été remplacée par la forme suivante que nous adopterons au cours de ce travail.

$$\log S = \beta' - K_s' - \frac{\Gamma}{2}$$

Dans cette équation $\frac{\Gamma}{2}$ représente la force ionique de la solution saline rapportée à 1000 cm³ de celle-ci. $\frac{\Gamma}{2}$ est défini par DEBYE comme étant une somme de termes constitués chacun par le produit de la concentration moléculaire stoechiométrique de chaque ion c par le carré de la valence : z^2 . La valeur de $\frac{\Gamma}{2}$ est donc définie par l'équation :

$$\frac{\Gamma}{2} = \frac{1}{2} \sum cz^2$$

C'est ainsi par exemple que la force ionique d'une solution 2 M d'un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassiques se calcule comme suit : La solution saline dont nous venons de définir la composition renferme par litre une molécule-gramme de phosphate monopotassique $\text{PO}_4\text{K}_2^- +$

K^+ et une molécule-gramme de phosphate dipotassique $PO_4H^{--} + K^+ + K^+$.

$$\text{D'où : } \frac{\Gamma}{2} = \frac{1}{2} \left[(1 \times 1^3 + 1 \times 1^3) + (1 \times 2^2 + 1 \times 1^2 + 1 \times 1^2) \right]$$

$$\text{c'est-à-dire } \frac{\Gamma}{2} = \frac{1}{2} \times 8 = 4.$$

Le terme K_s' qui figure dans l'équation de COHN a une signification physicochimique analogue à celle de K_S (salting out constant) de DEBYE et Mc AULAY. L'équation de COHN étant une relation linéaire l'on voit que K_s' définit le coefficient angulaire de la droite exprimant graphiquement les variations du logarithme de la solubilité de la protéine ($\log S$) en fonction des variations de la force ionique $\frac{\Gamma}{2}$. Ainsi qu'il a déjà été dit, sa valeur dépend de la protéine et de la nature du sel précipitant.

Il va sans dire que l'on peut rapporter la force ionique soit, comme nous l'avons fait jusqu'ici, à 1000 cm^3 de solution, soit à 1000 g. d'eau. On la désigne dans le premier cas par $\frac{\Gamma}{2}$ et dans le second par μ . Les deux formes correspondantes de l'équation de COHN sont :

$$\begin{aligned} \log S &= \beta' - K_s' \frac{\Gamma}{2} & \text{et} \\ \log S &= \beta - K_s \mu \end{aligned}$$

La dernière est, théoriquement, la plus rigoureuse, car les résultats rapportés à l'unité de poids d'eau présentent un caractère absolu. Elle est, néanmoins d'un usage plus restreint que la première.

En effet, les erreurs inhérentes à la détermination de μ dans les solutions protéiques sont multiples. Il est en particulier difficile de mesurer avec une précision satisfaisante le volume occupé par l'hydrate de protéine et, par ailleurs l'espace solvant et l'eau liée aux molécules protéiques sont d'une détermination aussi délicate qu'incertaine en présence de sels neutres à forte concentration. Aussi considère-t-on la première des équations de COHN, directement applicable aux données expérimentales, comme permettant, en général, une caractérisation satisfaisante des protéines, bien que ses constantes n'aient pas une valeur absolue.

La détermination directe des valeurs de K_s' et de β' a été réalisée en 1930 pour le fibrinogène par FLORKIN, pour l'hémoglobine d'Homme et de Cheval par COHN, GREEN et BLANCHARD en

1931, pour la sérumalbumine et la sérumglobuline par A. BONTOT en 1934, pour la myoglobine par MORGAN en 1936, pour diverses hémoglobines, pour des hémocyanines et pour l'hémerythrine du Siponcle par J. ROCHE et Y. DERRIEN en 1939.

Les expériences réalisées en 1930 par FLORKIN [6] sur le fibrinogène du plasma sont une application directe de la loi de COHN à cette protéine. FLORKIN a déterminé les valeurs de K_s et β pour cette protéine dans des solutions de divers sels et à des pH variables. Les résultats obtenus sont pour ClNa : $\log S = 1,61 - 0,91 \mu$ à 25° et à $pH = 5,8$; pour les phosphates de potassium : $\log S = 3,09 - 1,95 \mu$; pour le sulfate d'ammonium à $pH = 6$: $2,51 - 1,33 \mu$ à $pH = 6,6$: $2,81 - 1,33 \mu$. Si on envisage la solubilité du fibrinogène dans les différents sels à concentration élevée on voit que l'ordre relatif de ces sels est celui donné ordinairement dans les séries d'HOFMEISTER.

Sel	pH	K_s	β
NaCl.....	5,8	0,91	1,61
SO ₄ (NH ₄) ₂	6	1,33	2,51
	6,6	1,33	2,81
PO ₄ K ₂ H et PO ₄ K H ₂	6,6	1,95	3,09

K_s est donc une constante qui dépend de la protéine étudiée et du sel précipitant et n'est influencée ni par la température ni par le pH tandis que la valeur de β varie lorsque ces facteurs sont modifiés.

L'année suivante, GREEN [7] publia des recherches particulièrement intéressantes sur la solubilité de l'hémoglobine de Cheval dans les solutions salines concentrées. Les travaux portent sur les variations de solubilité de l'oxyhémoglobine et de la carboxyhémoglobine dans des solutions salines à température et à pH variables. La valeur de K_s' pour la carboxyhémoglobine dans les solutions de phosphates de potassium demeure inchangée si la température et le pH varie, tandis que celle de β' se modifie alors.

Concentration en PO ₄	$\frac{\Gamma}{2}$	μ	Hémogl. litre	Hémogl. p 1.000 g. d'eau	$\log S$ pour 1.000 g. d'eau
1,072	2,20	2,32	6,59	6,94	0,841
1,462	3,00	3,20	1,04	1,11	0,045

L'auteur a également étudié les variations de la solubilité avec la température. Il a opéré avec de la carboxyhémoglobine à 0° et à 25°. La valeur de K_s' est constante et égale à 0,88 aux deux températures tandis que β' varie.

Les valeurs de K_s' et β' sont pour l'oxyhémoglobine à 0° :

$$K_s' = 0,879$$

$$\beta' = 3,79$$

pour la carboxyhémoglobine à 0° :

$$K_s' = 0,885$$

$$\beta' = 3,86$$

Les courbes de $\log S$ en fonction de $\Gamma/2$ sont par conséquent superposables dans des solutions salines concentrées.

En supposant que K_s' ne varie pas avec la température les valeurs de β' seraient indépendantes de la concentration en sel, mais dépendraient de la température, comme du pH. En faisant varier le pH des solutions, la solubilité de la carboxyhémoglobine dans les solutions de phosphates de potassium est modifiée. K_s' demeure constant, mais on remarque des variations de β' telles que la solubilité est augmentée 10 fois en passant de pH = 6,6 à pH = 7,4. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de SÖRENSEN et HOYRUP, de COHN sur la solubilité de l'albumine d'œuf dans le sulfate d'ammonium à différents pH et de ceux de FLORKIN relatifs au fibrinogène [6]. Il est donc certain que la solubilité d'une protéine en présence de sels neutres varie avec le pH et la température, tandis que K_s' demeure constant.

Mais des variations de K_s' apparaissent lorsque GREEN étudie la solubilité d'une même hémoglobine dans des solutions contenant différents électrolytes. L'ordre décroissant des valeurs K_s' pour les différents sels est le suivant : citrate de sodium : 1,29 ; phosphates de potassium : 1,15 ; sulfate de sodium : 1,08 ; sulfate d'ammonium : 0,84 ; sulfate de magnésium : 0,62.

La détermination de β' et K_s' pour différents électrolytes est une expression exacte du pouvoir précipitant de ceux-ci sur la protéine étudiée. La valeur de K_s' refléterait une caractéristique profonde de la protéine.

Parmi les autres protéines pures étudiées au point de vue de leur solubilité dans les sels neutres en solution concentrée, nous citerons la sérumalbumine et la sérumglobuline de Bœuf.

A. BONOT [9], a repris les travaux antérieurs de SÖRENSEN sur la tendance à la dissociation des protéines, mettant en évidence l'influence de ce phénomène sur leur solubilité globale. Il opère sur de la sérumalbumine de Bœuf isolée selon la technique de SÖRENSEN. Il a étudié l'influence de la concentration en protéide dissous sur l'allure de la variation de la solubilité. La quantité de protéide dissoute varie en fonction de la quantité d'hydrate de protéide présente dans la fraction utilisée. Pour des concentrations en sels différentes, les courbes de solubilité en fonction de la quantité de protéine présente sont homothétiques. Une forte concentration en protéine ne modifie pas le phénomène.

A. BONOT s'attache particulièrement à la notion de *solubilité limite*, qui peut être ainsi définie : s représentant la solubilité d'une fraction de protéide en fonction de la quantité z d'hydrate de protéide présente dans 100 g. de l'eau du solvant dans le mélange total du précipité et de la solution, on appelle solubilité limite la valeur vers laquelle tend le rapport $\frac{\Delta s}{\Delta z}$ quand $\frac{s}{z}$ tend vers zéro. La composition du précipité se rapproche dans ce cas de plus en plus de celle de la fraction protéidique utilisée dans l'expérience. La solubilité limite est pratiquement atteinte, dans le cas d'une fraction de sérumalbumine, quand le rapport de la quantité de protéine hydratée dissoute à la quantité mise en œuvre pour 100 g. d'eau devient inférieur à 0,01. A. BONOT constitua des mélanges artificiels de trois fractions différentes d'albumines et il constata que la solubilité-limite de chacun de ces mélanges est comprise entre les solubilités limites extrêmes des fractions composantes et se trouve aproximativement représentée par l'équation de COHN.

Au cours de ces dernières années, STEINHARDT [25] reprenant les expériences de SÖRENSEN et de BONOT a pu mettre en évidence certaines anomalies présentées par les caractères de solubilité de protéines cristallisées. Ses recherches, sur la pepsine cristallisée (NORTHROP), ont été effectuées selon la technique suivante : les cristaux d'enzyme sont mis en contact à la température de 5° avec une solution de HCl 0,002 M additionné d'une proportion de KCl telle que la force ionique de la solution ait une valeur comprise entre 0,002 et 0,10. Lorsque la saturation de la phase liquide est atteinte on filtre. Les cristaux sont alors remis en contact avec une nouvelle

quantité de la solution initiale, et ceci jusqu'à épuisement de la phase solide. On dose l'azote protéique dans les filtrats.

La courbe obtenue en rapportant pour chaque détermination le logarithme de la solubilité de la protéine, $\log \frac{\Delta s}{\Delta v}$ (logarithme de la quantité de protéine dissoute par unité de volume) en fonction de $\Sigma \Delta v$, qui représente la somme des volumes de solvant rajoutés au cours de chaque expérience est une droite. La solubilité des cristaux de pepsine n'obéit donc pas à la règle des phases. Par ailleurs STEINHARDT démontre que la pente de la droite logarithmique, établie comme nous venons de le voir, est en rapport avec le degré de pureté de l'enzyme.

Une nouvelle contribution à l'étude de la comparaison de certains caractères physico-chimiques des constituants protéiques du sang chez différents animaux devait être apportée par les recherches de J. ROCHE et Y. DERRIEN sur les caractères de solubilité des chromoprotéides respiratoires de quelques Vertébrés marins, des hémoglobines, des hémocyanines et de l'hémérythrine du Siponcle.

Ces auteurs ont établi des courbes de solubilité en présence de sulfate d'ammonium à $\text{pH} = 6,5$, en dosant les protéines non précipitées par la méthode de A. ROCHE et F. MARQUET. La comparaison avec les données obtenues sur de l'hémoglobine de Cheval recristallisée trois fois à l'alcool montre que les valeurs de β' *diffèrent* tandis que les pentes des droites obtenues (K_s') sont presque les mêmes. Ici encore l'examen des constantes de précipitation permet de constater que K_s' est bien caractéristique de la protéine et du sel précipitant tandis que β' est en rapport avec la spécificité de la globine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de HEIDELBERGER et LANDSTEINER [9], lesquels ont établi une méthode de différenciation des oxyhémoglobines d'espèces variables au moyen de tests de solubilité. Ils se basent sur le fait que les solubilités de substances ne réagissant pas les unes sur les autres s'ajoutent. Par conséquent si deux hémoglobines sont différentes chacune se dissoudra dans une solution saturée de l'une comme dans de l'eau pure. Par ailleurs, si deux préparations sont identiques une solution saturée de l'une sera également saturée par rapport à l'autre. La méthode élaborée par ces auteurs est comparative. Ils ont abouti aux résultats suivants, dans les-

quels la solubilité est exprimée en grammes par rapport à 1 cm³ de solution initiale.

Cobaye + Cobaye	0,0040	Rat + Rat	0,0039
Cobaye + Rat	0,0071	Rat + Cobaye	0,0086
Différence	0,0031	Différence	0,0047
Chien + Chien	0,0256	Cheval + Cheval	0,0107
Chien + Cheval	0,0356	Cheval + Chien	0,0293
Différence	0,0100	Différence	0,0186
Chien + Chien	0,0256	Cobaye + Cobaye	0,0046
Chien + Cobaye	0,0274	Cobaye + Chien	0,0318
Différence	0,0018	Différence	0,0272
Cheval + Cheval	0,0107	Cobaye + Cobaye	0,0046
Cheval + Cobaye	0,0140	Cobaye + Cheval	0,0159
Différence	0,0033	Différence	0,0113
Cheval + Cheval	0,0166	Ane + Ane	0,0086
Cheval + Ane	0,0139	Ane + Cheval	0,0128
Différence	0,0027	Différence	0,0042

En résumé, la règle d'addition des solubilités peut être appliquée à la différenciation des hémoglobines d'espèces diverses. Tandis que les pigments de Cheval, de Chien, de Rat et de Cobaye présentent des différenciations, ceux d'Ane et de Cheval présentent une certaine similitude.

L'hémérythrine, chromoprotéide respiratoire du Siponcle a donné lieu à des recherches effectuées par J. ROCHE et Y. DERRIEN [15] soit avec le sulfate d'ammonium soit avec les phosphates de potassium comme agent précipitant. La protéine étudiée précipite entre 1,3 et 1,6 M pour le sulfate d'ammonium et 1,2 et 1,5 M pour les phosphates. Elle se comporte donc comme une globuline.

Sel	β'	K_s'
SO ₄ (NH ₄) ₂	6,13	1,50
Phosphates de K	4,53	1,82

K_s' a la même valeur que pour la pseudoglobuline de Cheval, pour laquelle il est égal à 1,47.

Des expériences du même ordre ont été poursuivies par J. ROCHE et Y. DERRIEN [14] sur les hémocyanines d'un crustacé. *Cancer Pagurus*, et de plusieurs mollusques : *Eledone moschata*, *Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis*. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

Espèce	Limites de précipitation		β'	K_s'
	$\frac{\Gamma}{2}$	P. 100 de la saturation en $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$		
Tourteau (<i>Cancer pagurus</i>) .	4,8-7,2	40-60	5,48	1,02
Eledone (<i>Eledone moschata</i>).	3,6-5	30-42	6,54	1,84
Poulpe (<i>Octopus vulgaris</i>)...	3,7-4,8	31-40	7,07	2,00
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)...	4,2-5,4	35-45	8,31	2,02

Ces données démontrent la spécificité des diverses hémocyanines.

D'autres, que nous ne faisons pas figurer ici, traduisent le fait que les hémocyanines se comportent pour la plupart comme des corps hétérogènes. Ce n'est qu'exceptionnellement que les variations du logarithme de la solubilité en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ sont représentées par une droite chez ces pigments. C'est là une observation en plein accord avec celle faite par SVEDBERG sur l'ultrafiltration des mêmes corps. Un phénomène du même ordre avait du reste été signalé par ROCHE et COMBETTE sur les érythrocrucorines polydispersées de certains Vers.

2. Cas des mélanges.

Nous n'avons envisagé jusqu'ici que les recherches entreprises dans le domaine de la solubilité sur des corps purs. Considérons maintenant le cas des mélanges de diverses protéines tels que le sérum. Le sérum renferme en moyenne 7 g.,50 de protéines par 100 cm³ chez les Mammifères. Le mélange de

ces corps peut être fractionné. PANUM le premier a essayé de réaliser cette opération en 1851 et HORMEISTER a, par la suite, préconisé l'emploi du sulfate d'ammonium pour le fractionnement des protéines sériques, par la demi-saturation en sel. La première précipitant lorsque celle-ci est atteinte est la globuline, l'albumine restant alors en solution. HAMMARSTEN effectue un fractionnement au moyen de sels neutres qui ne précipitent que les globulines en présence d'albumines. M. EMIL montre qu'une dialyse permet de séparer des protéines d'un produit insoluble dans l'eau distillée, qu'il appelle euglobuline ; l'autre fraction des protéines précipitables comme la première par le sulfate d'ammonium est appelée pseudoglobuline.

Pour SÖRENSEN, les globulines du sérum existent sous forme de complexes réversiblement dissociables dont l'équilibre est constamment modifié selon les conditions du milieu. Ces résultats ont été confirmés par SVEDBERG dans ses recherches sur la détermination des poids moléculaires par ultracentrifugation.

Divers auteurs ont utilisé les sels neutres pour effectuer la séparation et étudier la solubilité des fractions albuminiques et globuliniques des sérums et humeurs dérivées (liquides d'ascites). HOWE emploie dans ce but le sulfate de soude. BUTLER et MONTGOMERY utilisent des solutions équimoléculaires 3 M de phosphates mono et dipotassiques à $\text{pH} = 6,5$. Les données de COHN sur les variations de la force ionique des solutions de phosphates de potassium montrent que ces sels sont particulièrement aptes au relargage des protéines. On peut en les employant faire varier indépendamment du pH la concentration en sel et en protéines, la température, et ainsi exprimer la solubilité de la protéine étudiée comme une fonction de chacune de ces variables. Les résultats peuvent être traduits par une courbe sur laquelle on porte en abscisses les concentrations en phosphates exprimées en molarité, et en ordonnées la quantité d'azote contenue dans 1.000 cm^3 de solution, cette dernière étant exprimée en grammes. La figure obtenue dans le cas du sérum de Cheval traduit l'existence de trois fractions nettes. La courbe logarithmique présente des points anguleux dont chacun correspond au début de précipitation d'une fraction protéique. Les limites de précipitation

obtenues sont : fibrinogène : 0,7-1,1 M ; euglobuline : 1,2-1,35 M ; pseudoglobuline : 1,5-1,6 M ; albumine : 2,4-2,5 M.

Les données de TORBEN GEILL établies au moyen du sulfate d'ammonium sont comparables à celles de BUTLER et MONTGOMERY. Dans les deux cas, les expériences de ces auteurs ne mettent pas en évidence que la relation de COHN s'applique à la précipitation des complexes protéiques, probablement en raison de l'entraînement des protéines les unes par les autres (adsorption) au cours de leur relargage dans un mélange.

En 1936, A. ROCHE, DORIER et SAMUEL [17] ont apporté une contribution nouvelle à l'étude des caractères biochimiques des protéines sériques. Ils sont arrivés aux conclusions suivantes : Dans un sérum humain normal, la précipitation de la globuline s'effectue dans une zone comprise entre 30 et 60 p. 100 de sulfate d'ammonium saturé. Contrairement à ce qui a lieu dans le cas du sérum de Cheval, il n'y a pas de fractionnement de la globuline au tiers de la saturation. La précipitation de l'albumine s'effectue entre 60 et 70 p. 100 de la saturation en sel.

Enfin le rapport : albumine/globuline (A/G) obtenu à 60 p. 100 de la saturation en sel est égal à 0,50 et non à 1 comme dans le cas où on opère un fractionnement par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Ces recherches ont été poursuivies par A. ROCHE, L. SAMUEL et ARTAUD [22], lesquels ont étudié les caractères de solubilité des protéines sériques et la signification du rapport A/G. Ils s'inspirent des données antérieures de BUTLER et MONTGOMERY.

SAMUEL [24] a étudié l'influence de la concentration et du pH sur l'allure de la courbe de précipitation. Il a obtenu les résultats suivants : la dilution ne modifie pas la nature des fractions qui précipitent mais amène un décalage dans la précipitation. Des expériences parallèles effectuées à différents pH montrent que la précipitation des protéines sériques par le sulfate d'ammonium s'effectue d'une manière identique dans une marge de pH comprise entre 6,2 et 5,7.

Afin d'établir avec précision le rapport A/G, A. ROCHE, SAMUEL et ARTAUD, ont préparé des protéines sériques pures. Ils opèrent sur des globulines et des albumines à partir desquelles ils constituent des sérums artificiels à des concentrations diverses. Les données obtenues montrent que, dans un

mélange de globuline et d'albumine, les deux corps ne conservent leurs caractères de solubilité propres que pour une faible concentration en protéines. Dans le cas contraire l'albumine précipite en même temps que de la globuline, à un taux en sel neutre pour lequel elle demeure en solution quand elle est étudiée à l'état pur.

De ces travaux SAMUEL conclut que le rapport A/G établi à la molarité 2 ne peut être considéré que comme un indice.

Plus récemment, se basant sur les résultats de E. J. COHN ayant établi qu'on pouvait caractériser une protéine par l'expression de sa solubilité dans les solutions salines concentrées selon une équation exponentielle, J. ROCHE, Y. DERRIEN et M. S. CHOUAÏECH [16] ont mis en évidence les caractères spécifiques des protéines sériques de quelques Vertébrés marins.

La relation de E. J. COHN a permis à ces auteurs de caractériser avec précision les constituants sériques dans des milieux salins contenant soit du sulfate d'ammonium, soit des phosphates de potassium à fortes molarités.

Les expériences ont porté sur les sérums de Cheval (*Equus caballus*) de Lamproie Marine (*Petromyzon marinus*), de Torpue de mer (*Thalassochelys caretta*), de Requin peau bleue (*Carcharias glaucus*), de Murène (*Murena helena*), d'Anguille (*Anguilla vulgaris*). Les courbes ont été établies selon la méthode mise au point par A. ROCHE et L. SAMUEL [22]. Les sérums, quelle que soit leur origine zoologique, renferment tous :

1° une euglobuline qui précipite pour une valeur de $\frac{\Gamma}{2}$ variant entre 3,6 et 4,5 et 4,2 à 4,6, 2° une pseudoglobuline qui précipite pour une valeur de $\frac{\Gamma}{2}$ variant entre 4,2 à 6 et 7,2 à 8,4. Il existe deux fractions pseudoglobuliniques chez le Cheval, tandis que le sérum des animaux marins étudiés paraît contenir une pseudoglobuline homogène, 3° des albumines qui précipitent pour une force ionique variant entre 7,2 et 8,4.

L'application de l'équation de COHN aux fractions protéiques de sérums d'animaux marins a permis de déterminer les constantes suivantes :

Espèce	Pseudoglobuline		Sérumalbumine	
	β'	K_s	β'	K_s
Cheval (<i>Equus caballus</i>)....	1,17	0,38	8,37	1,20
Tortue de mer (<i>Thalasso chelys caretta</i>).....	1,66	0,40	6,55	0,98
Anguille (<i>Anguilla vulgaris</i>).	1,70	0,38	—	—
Murène (<i>Murena helena</i>)....	2,31	0,42	—	—
Requin (<i>Carcharias glaucus</i>)	0,88	0,37	5,48	0,96
Lamproie (<i>Petromyzon ma- rinus</i>)	1,26	0,39	6,37	0,98

Le coefficient angulaire des droites obtenues est nettement différent selon que l'on se trouve en présence des pseudoglobulines ou des albumines. La valeur de K_s par contre est assez constante pour chaque groupe de protéines, tandis que β' varie. Ceci montre que la solubilité des protéines étudiées dans le sulfate d'ammonium est identique tandis que leur solubilité dans l'eau (représentée par β') est différente.

Il faut cependant faire une réserve sur la portée des résultats de J. ROCHE, Y. DERRIEN et M. S. CHOUAÏECH. Ces données correspondent à des protéines telles qu'elles existent dans le sang, et non à des protéines purifiées. Une étude comparative de la solubilité des protéines sériques et de celles contenues dans les transsudats (liquide d'ascite des cirrhotiques) a été effectuée en 1939 par J. ROCHE, J. OLMER et L. SAMUEL [20]. Le sel précipitant est le sulfate d'ammonium à 22° et à pH = 6,1. Le mode opératoire suivi est celui qu'ont établi A. ROCHE, M. DORIER et L. SAMUEL [17].

Cette étude conduit à admettre l'existence d'un excès d'albumine dans les liquides d'ascite. De plus les protéines contenues dans ces humeurs peuvent présenter des modifications tenant à leur vieillissement ou à leur état de dilution. Le fait que les transsudats sont beaucoup plus riches en albumine que les sérums à partir desquels ils ont pris naissance traduit le passage plus facile des albumines du plasma à travers les vaisseaux au niveau desquels se constitue le transsudat. Cela s'explique si on rappelle que les albumines ont un poids moléculaire plus faible que les globulines.

II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LA SOLUBILITÉ DES HÉMOGLOBINES DANS DES MILIEUX DE CONCENTRATION CROISSANTE EN SELS NEUTRES.

1. Recherches sur la préparation des hémoglobines.

La solubilité des hémoglobines dans les milieux de concentration élevée en sels neutres a été mise à profit dans des recherches de deux ordres. Les premières, purement qualitatives, ont utilisé la précipitation fractionnée des protéines accompagnant les pigments dans des milieux naturels (hémolysats globulaires, extraits de muscles) pour séparer les hémoglobines et, ceci fait, les faire cristalliser. Les secondes ont eu pour but la détermination des constantes de solubilité de l'équation de COHN pour caractériser les diverses hémoglobines.

Parmi les méthodes de préparation des hémoglobines, dont nous décrirons les principales dans un prochain paragraphe, certaines reposent sur l'emploi des sels neutres comme agents de précipitation ou de cristallisation. L'un des procédés classiques de préparation des hémoglobines consiste à traiter dans un premier temps les hémolysats globulaires par du sulfate d'ammonium à demi-saturation. Le précipité formé entraîne avec lui la plus grande partie des stromas ; il est séparé par filtration ou centrifugation et l'hémoglobine cristallise dans la phase liquide, soit spontanément, soit après enrichissement progressif en sel neutre, lequel est réalisé de manière optima par dialyse contre une solution saturée en sulfate d'ammonium. Ce procédé a permis d'obtenir à l'état cristallisé de nombreuses hémoglobines ou des dérivés de celles-ci (méthémoglobines, carboxyhémoglobines). C'est une application de la méthode générale de cristallisation des protéines proposée par HOPKINS, HOFMEISTER, et dont l'étude approfondie a été poursuivie par SÖRENSEN dans ses travaux sur la cristallisation de l'ovalbumine. L'emploi du sulfate d'ammonium présente l'inconvénient d'exiger un contrôle permanent du pH des solutions, dont le pouvoir tampon est extrêmement minime. Or, dans le cas particulier de l'hémoglobine, il convient, pour éviter une méthémoglobinisation, de ne pas acidifier le milieu. Aussi, certains auteurs, en particulier GREEN, DELRUE ont-ils substitué à ce sel des mélanges de tampons de

phosphates mono et dipotassiques de molarité très élevée. Comme la précipitation des diverses protéines pouvant exister avec les hémoglobines est fonction de la force ionique des milieux, beaucoup plus que de la nature du sel employé, on comprend que les fractionnements soient possibles aussi bien par le sulfate d'ammonium que par les phosphates de potassium à concentration croissante.

Un exemple particulièrement remarquable d'application de ce principe est celui réalisé par MORGAN [11] pour la préparation de l'hémoglobine musculaire de Cheval. La préparation de ce corps comporte en effet dans un premier temps la séparation de l'ensemble des protéines présentes dans l'extrait de muscle à l'exception de la myoglobine par un mélange tampon de phosphates mono et dipotassiques à concentration telle que le milieu est presque saturé en ces sels. Or, cette concentration réalise une molarité insuffisante pour précipiter la myoglobine. Celle-ci demeure donc en solution et peut être obtenue alors par un enrichissement du milieu en sulfate d'ammonium, lequel permet d'obtenir une solution de molarité plus élevée.

Telles sont les applications qualitatives les plus importantes de l'emploi des sels neutres pour la préparation des hémoglobines. Bornons-nous à les signaler ici, leur étude critique ayant fait l'objet d'une partie de nos recherches.

2. Recherches sur la détermination des constantes de solubilité des hémoglobines.

Se basant sur les données numériques antérieurement acquises par l'un de ces auteurs [7], GREEN, COHN et BLANCHARD [8] ont mis en évidence les différences quantitatives existant entre deux hémoglobines d'espèces différentes : les hémoglobines d'Homme et de Cheval, étudiées sous la forme de dérivés oxycarbonés.

Ces protéines manifestent une différence notable de solubilité dans les tampons de phosphates de potassium de molarité élevée. L'hémoglobine de Cheval est beaucoup moins soluble que celle d'Homme. Le pigment humain semble se comporter comme une albumine.

Le matériel de travail est ainsi obtenu par les auteurs. Les

globules de sang d'Homme adulte sont citratés et séparés du plasma par centrifugation. Deux ou trois lavages au moyen d'une solution saline isotonique les débarrassent totalement des protéines sériques. Le laquage est effectué par addition d'eau distillée. L'hémolysat obtenu est saturé par de l'oxyde de carbone, lequel transforme le pigment en carboxyhémoglobine.

L'hémoglobine humaine en solution saline diluée ne cristallise pas au voisinage du point isoélectrique. Mais sous l'action d'un tampon concentré de phosphates de potassium de molarité 2,8 M (la valeur du rapport $\frac{\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}}{\text{PO}_4\text{K}_2\text{H} + \text{PO}_4\text{KH}_2}$ étant égale à 0,58 et le pH égal à 6,8) les cristaux apparaissent.

Ce procédé a été employé pour deux préparations. Dans une troisième les expérimentateurs opèrent de la manière suivante. Les globules lavés dans une solution saline sont dialysés dans des tubes en cellophane pendant une nuit contre de l'eau courante. Le liquide obtenu par centrifugation est alors dialysé dans des tubes en cellophane contre le même tampon de phosphates de potassium qui avait servi lors des expériences précédentes. Au cours de la dialyse, la cristallisation s'effectue.

La solubilité des protéines dans les solutions salines concentrées étant une fonction de la concentration en sel, du pH et de la température, les auteurs ont utilisé des tampons de phosphates de potassium de pH et de force ionique connus. Les cristaux de carboxyhémoglobine sont traités par le tampon de phosphates et laissés en contact pendant un intervalle variant entre 12 et 48 heures, à 25°. L'azote est dosé dans les filtrats. La solubilité demeure constante pendant une semaine. Les résultats obtenus mettent en évidence la différence de comportement des deux carboxyhémoglobines. L'hémoglobine de Cheval présente un maximum de solubilité égal à 52 g. par litre dans un tampon de phosphates 0,33 M, de pH = 6,6 et à 25°. L'hémoglobine humaine présente la même solubilité dans un tampon de phosphate 1,96 M, mais pour une force ionique de 1,96 M l'hémoglobine de Cheval a une solubilité 1000 fois plus faible. La solubilité de l'hémoglobine de Cheval est représentée par la relation de COHN pour des forces ioniques supérieures à 2, l'hémoglobine humaine pour des forces ioniques supérieures à 5. Les constantes obtenues sont :

	pH	β'	K_s'
Carboxyhémoglobine de Cheval.....	6,6	3,09	0,71
Carboxyhémoglobine d'Homme.....	6,8	1,04	2,00

Ainsi, les hémoglobines d'espèces différentes peuvent être caractérisées d'une manière quantitative tant par leurs compositions en acides aminés, en fer et en soufre, que par leurs solubilités dans l'eau et dans diverses solutions salines concentrées.

En 1936, la solubilité de la myoglobine de Cheval cristallisée (THEORELL) a été étudiée par MORGAN. La grande différence de solubilité entre la carboxyhémoglobine et la myoglobine est une preuve de la spécificité de ces pigments. Les données de THEORELL indiquent pour le poids moléculaire de la myoglobine une valeur inférieure à celle de l'hémoglobine. Depuis, J. ROCHE et H. VIEIL [23] ont démontré que la myoglobine de Cheval a un poids moléculaire de 16.800, tandis que l'hémoglobine sanguine a chez le même animal un poids moléculaire égal à 68.000. Leurs résultats sont en accord avec ceux obtenus par PEDERSEN par une méthode différente. MORGAN a appliqué l'équation de COHN à la carboxy-myoglobine de Cheval.

Pigment	Par litre		Par 1000 g.	
	β'	K_s'	β	K_s
Carboxyhémoglobine de Cheval.	3,09	0,71	2,80	0,57
Carboxymyoglobine de Cheval .	8	0,94	6,12	0,57

On arrive à la relation $\log S = 8,00 - 0,94 \Gamma/2$. La carboxy-myoglobine de cœur de Cheval est presque entièrement dissoute dans les tampons de phosphates 3 M à pH = 6,6, concentration pour laquelle la solubilité de la carboxyhémoglobine sanguine de Cheval est inférieure à 1 p. 1.000.000. La différence de solubilité entre ces protéines traduit leur spécificité et permet d'effectuer leur séparation.

III. — RECHERCHES SUR LA PRÉPARATION D'HÉMOGLOBINES PURES.

Nous avons essayé au cours de nos recherches d'obtenir des protéines pures, afin de déterminer les constantes β' et K_s' de l'équation de COHN rendant compte de leur solubilité dans les solutions salines concentrées. Pour ce faire nous avons mis en œuvre des méthodes basées sur la précipitation fractionnée des hémolysats globulaires par les sels neutres, ou sur la cristallisation de l'hémoglobine qu'ils renferment.

1. Obtention d'un hémolysat globulaire.

Le sang total est défibriné au moyen de billes de verre. On centrifuge. Le sérum surnage. Les hématies sont lavées trois fois au sérum physiologique (solution de ClNa à 9 g. p. 1000) et laquées par addition d'un volume égal d'eau distillée. On ajoute quelques gouttes d'éther. On laisse 12 heures en glacière. Les stromas surnagent. On centrifuge. On filtre. Le produit obtenu est une solution d'hémoglobine sanguine dont la concentration est le plus souvent voisine de 10 p. 100. On vérifie d'ailleurs la concentration de chaque préparation ainsi obtenue, par un dosage au réfractomètre de PULFRICH (*).

Ces solutions constituent le matériel qui nous a servi à étudier la solubilité des hémoglobines dans les solutions salines concentrées. De telles recherches portent soit sur l'hémoglobine naturelle, soit sur la carboxyhémoglobine, soit sur la méthémoglobine. La carboxyhémoglobine est obtenue en faisant passer dans la solution d'hémoglobine résultant des opérations précédentes un courant d'oxyde de carbone pendant dix minutes. Au bout de ce temps la transformation est complète. La méthémoglobine, telle que nous l'avons préparée, résulte de l'action d'une solution saturée et fraîchement préparée de ferricyanure de potassium sur l'hémoglobine naturelle.

Les hémolysats ainsi obtenus sont-ils des solutions d'hémoglobine pure ? Pour répondre à cette question nous avons en-

(*) L'incrément spécifique de réfraction α' dans le cas de l'hémoglobine de Bœuf, déterminé par ROCHE (J.), ROCHE (A.), ADAIR (G. S.) et ADAIR (L. M.), est égal à 0,001942 [21].

trepris les recherches suivantes. Nous avons établi à l'aide des techniques qui seront décrites plus loin la courbe de relargage par les sels neutres des protéides que renferment de de tels hémolysats provenant de globules de diverses espèces animales. Nous nous bornerons à rapporter ici, à titre d'exemple l'un de ces essais effectué sur un hémolysat sanguin de Chien. L'examen de la figure 1 ci-après établie en portant en ordonnées les grammes d'azote protéique dissous par litre et en abscisses la force ionique des solutions salines, rend

compte des faits suivants : entre $\frac{\Gamma}{2} = 2,8$ et $\frac{\Gamma}{2} = 5,6$ la

courbe exprimant les variations de la solubilité protéique s'abaisse lentement ; elle est constituée par un certain nombre de segments d'exponentielle séparés par des points d'inflexion. L'étude de ce phénomène, à la lumière des recherches effectuées sur la solubilité des protéines sériques (voir page 32) montre qu'il est dû à la précipitation de globulines et d'albumines du sérum. Ces dernières ont vraisemblablement été introduites dans l'hémolysat par les hématies à la surface desquelles elles étaient adsorbées. Pour des forces ioniques supérieures à 5,6 il se produit un changement marqué dans l'allure de la courbe de relargage. Cette dernière décroît alors exponentiellement et tend asymptotiquement vers zéro. Ce segment de courbe correspond à la précipitation de l'hémoglobine seule. En effet l'application de la relation de COHN aux variations de la solubilité protéique dans la marge de force ionique que nous venons de définir s'exprime graphiquement par une droite. L'on peut dès lors considérer la va-

leur $\frac{\Gamma}{2} = 5,6$ comme caractérisant la concentration en sel pour laquelle l'hémoglobine seule demeure en solution *dans les conditions de l'expérience* (concentration en protéine, pH, température). Les valeurs expérimentales données à titre d'exemple dépendent en outre de la nature du sel précipitant et des caractères spécifiques de l'hémoglobine étudiée.

2. Techniques de purification.

Les recherches décrites dans le paragraphe précédent permettent de définir la concentration en sel à laquelle l'hémo-

globine seule demeure à la phase dispersée. Il nous est apparu dès lors que la précipitation des protéines sériques présentes dans l'hémolysat, par addition à ce dernier d'un volume de solution saline tel que la force ionique du milieu atteigne la valeur déterminée par l'opération précédente, devait constituer une technique de purification sûre et rapide. Les essais que nous avons effectués dans cette voie nous ont rapidement démontré qu'une telle technique n'est pas applicable à toutes les hémoglobines animales. De ce point de vue ces dernières peuvent être groupées en deux catégories, à savoir d'une part les hémoglobines peu solubles et très facilement cristallisables (Cheval, Mulet) et d'autre part celles plus solubles et présentant une moins grande aptitude à cristalliser (Homme, Chien, Porc). Les tentatives de purification des premières par une telle précipitation entraînent régulièrement une cristallisation à peu près totale du pigment dans l'hémolysat, de telle sorte que l'hémoglobine ne peut être séparée du précipité protéique. La technique précédente n'est applicable qu'aux hémoglobines appartenant à la seconde catégorie. Nous allons décrire successivement les modes de purification que nous avons utilisés dans l'un et l'autre cas.

a) *Cas des hémoglobines ayant une aptitude relativement faible à la cristallisation.* — L'hémolysat globulaire est additionné d'un volume de la solution saline concentrée tel que la valeur de la force ionique du milieu assure une précipitation totale des protéines sériques qu'il renferme (voir § 1, 2). L'on homogénise le mélange, et après deux heures de séjour à la température du laboratoire, on filtre. Le précipité est constitué par les protéines sériques ; il renferme en outre des quantités notables d'hémoglobine. Ceci tient à ce que l'opération précédente a été effectuée sur un milieu renfermant de 10 à 20 fois plus de protéines totales que ceux utilisés dans l'établissement de la courbe de relargage. L'expérience nous a montré que la concentration saline pour laquelle le pigment commence à précipiter est sensiblement plus basse dans le premier cas que dans le second.

Le filtrat ne renferme que l'hémoglobine. Ainsi que la figure 1 en fait foi, la courbe de relargage (II) établie à partir de ce filtrat ne présente en effet plus aucun accident dans la marge de force ionique correspondant à la précipitation des

protéines sériques ; elle affecte une allure exponentielle. La variation de $\log S$ en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ est représentée graphiquement par une droite (II'), ce qui est un critère rigoureux de la pureté de la solution du chromoprotéide ainsi isolé. Il convient cependant de souligner qu'il n'en est pas toujours ainsi. Deux cas peuvent se présenter : ou bien la purification totale du pigment n'a pas été atteinte par l'opération précédente, dans ce cas un nouveau fractionnement permet toujours d'atteindre ce but ; ou bien la courbe de relargage de l'hémoglobine et son expression logarithmique traduisent la présence de deux protéines dans la solution. Il s'agit alors de la coexistence de deux hémoglobines différentes dans les hématies de l'espèce animale considérée (cas du Cheval par exemple, voir discussion des résultats page 75).

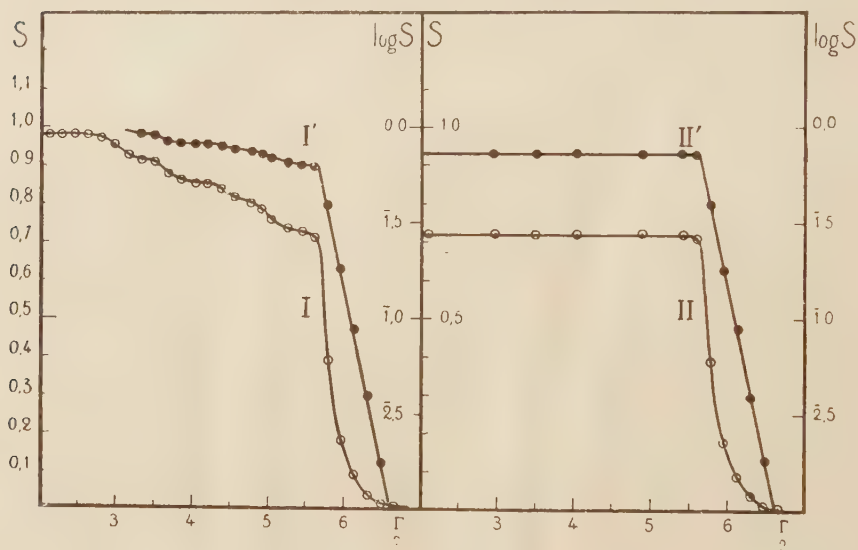


FIGURE 1. — Variations de la solubilité S (o—o) des protéines totales d'un hémolysat de Chien (I) et de l'hémoglobine purifiée (II) en provenant et variations de $\log S$ (●—●) calculées à partir des variations de S (I' et II'), en fonction de la concentration du milieu en mélange équimoléculaire de phosphate mono- et dipotassique à $\text{pH} = 6,50$ et 22° .

Abscisses : force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : à gauche, S (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution ; à droite, $\log S$).

Les hémoglobines cristallisées ont été obtenues à partir de leurs solutions pures à la température du laboratoire et à un

pH voisin de 6,8 (pH isoélectrique du pigment), par un enrichissement en sel (addition de solution saline concentrée) jusqu'à apparition d'un trouble. L'on constate au bout de douze heures une cristallisation partielle de l'hémoglobine. Dès lors de nouvelles additions de solution saline entraînent en 48 heures une cristallisation totale du pigment. On sépare les cristaux par centrifugation ou par filtration et on les lave trois fois avec une solution saline de même force ionique que la solution mère. Après un nouveau lavage par une solution saline sensiblement plus concentrée on les remet en suspension dans un volume approprié de cette dernière. De cette manière le liquide ne contient aucune trace de pigment en solution ce qui est indispensable pour l'établissement correct des courbes de redissolution de cristaux.

b) *Cas des hémoglobines très facilement cristallisables.* — De telles hémoglobines ne peuvent pas être purifiées par la technique exposée ci-dessus. L'enrichissement en sel de l'hémolysat qui les renferme entraîne, nous l'avons dit, non seulement la précipitation des protéines sériques, mais encore la cristallisation presque instantanée du pigment. Il convient d'ailleurs de noter que le procédé de purification par fractionnement ne serait pas applicable à ces hémoglobines, même au cas où ces dernières ne présenteraient pas une aptitude aussi marquée à la cristallisation. Ce sont en effet des hémoglobines nettement moins solubles que celles dont nous nous sommes occupés précédemment. Elles précipitent dans la même marge de concentration en sels que les albumines sériques et les globulines les plus solubles. Aussi avons-nous dû leur appliquer l'une des techniques classiques de purification, à savoir la cristallisation en milieu alcoolique. Elle consiste à ajouter à un hémolysat globulaire un volume d'alcool tel que le titre de la solution atteigne 25° alcooliques. Cette addition d'alcool est effectuée par très petites quantités à la fois et en agitant constamment afin d'éviter la dénaturation partielle du pigment. La solution est alors filtrée et mise à la glacière. On obtient ainsi en douze heures la cristallisation de l'hémoglobine. Les cristaux sont séparés des eaux mères par centrifugation et lavés deux ou trois fois avec de l'eau à 0° C. On les reprend enfin dans de l'eau à 15° C où ils se redissolvent. L'on recristallise enfin le pigment en présence de

solution saline concentrée, selon la technique indiquée au paragraphe précédent.

Ce mode opératoire nous a conduit dans tous les cas à l'obtention d'hémoglobines pures.

IV. — ÉTABLISSEMENT DES COURBES DE RELARGAGE OU DE REDISSOLUTION DE CRISTAUX.

Le mode opératoire suivi dans une telle expérience est décrit dans la thèse de F. MARQUET [10]. On dispose d'une série de tubes à essai, dont chacun contient dans un volume total identique, soit 20 cm³, la même quantité d'hémoglobine et une quantité de sulfate d'ammonium progressivement croissante du tube n° 1 au tube n° 19. Le détail du protocole expérimental adopté pour une expérience (relargage) est schématisé par le tableau ci-contre (*).

Les divers milieux ainsi mélangés en vue de la constitution d'une série d'essais sont portés au même pH, mesuré à l'électrode de verre, afin que l'ensemble des expériences soit pour-suivi dans des conditions rigoureuses de pH. Des mesures faites à la fin de l'essai permettent de s'assurer que le pH des milieux n'a pas subi de variations importantes pendant le temps d'équilibre. Cette précaution est indispensable lorsque les courbes ont été établies en présence de sulfate d'ammonium ; elle s'est révélée superflue dans les expériences pour-suivies en présence de phosphates mono et bipotassique, en raison du pouvoir tampon important des solutions de ceux-ci à pH = 6,50.

Quelques détails opératoires méritent d'être mentionnés. Dans le cas du relargage, les trois milieux sont simplement mélangés dans l'ordre suivant : sel neutre, eau, hémoglobine. Dans le cas de la redissolution de cristaux il convient de prendre des précautions nécessaires pour que les échantillons étudiés soient homogènes (agitation).

Dans les premiers tubes il ne se produit aucun relargage et la dissolution des cristaux est totale, la quantité de protéi-

(*) Dans un petit nombre de cas nous n'avons pu déterminer qu'un petit nombre de points de la série décrite au tableau de p. 47 ; nous avons alors localisé notre étude aux concentrations en sels les plus élevées auxquelles log S en fonction de I/2 présente les variations les plus significatives et pouvant être appréciées avec le plus de précision.

nes, contenue dans les filtrats de ces derniers est sensiblement la même que celle du tube n° zéro, ne contenant pas de sulfate d'ammonium. Après homogénéisation par agitation on place les tubes dans un thermostat à agitation réglé à une température voisine de $22^{\circ} \pm 0,10$, où la précipitation s'effectue pendant 14 à 18 heures. On filtre rapidement jusqu'à filtrats clairs en évitant une concentration par évaporation. L'azote protéique est dosé dans les filtrats par la technique suivante.

Méthode de dosage de l'azote protéique en présence des sels ammoniacaux A. ROCHE et F. MARQUET [19].

Cette méthode consiste à précipiter les protéines dans le milieu salin obtenu après précipitation par le sulfate d'ammonium en solution saturée, par une solution tano-acétique. Le précipité est lavé avec un réactif de lavage tano-potassique pour chasser l'ion ammonium. L'azote est dosé après minéralisation sulfurique par la microméthode de KJELDAHL.

Les réactifs suivants sont nécessaires :

1° Réactif de HÉDIN :

Tanin	70 g.
Chlorure de sodium	100 g.
Acide acétique cristallisable	50 g.
Eau distillée	q. s. p. 1000 g.

2° Solution saturée de sulfate de potassium.

3° Réactif de lavage :

Réactif de HÉDIN	10 cm ³
Solution saturée de SO ₄ K ₂	50 cm ³
Eau distillée	q. s. p. 1000 cm ³

MODE OPÉRATOIRE. — On prélève X cm³ de filtrat. On ajoute 7-X cm³ d'eau distillée, 2 cm³,5 de sulfate de potassium saturé et 0 cm³,5 de réactif de HÉDIN. On agite. On laisse 30 minutes à 37°. La précipitation des protéines est alors totale. On centrifuge quelques minutes, puis on aspire le liquide surnageant à l'aide d'une pointe fine adaptée à une trompe à eau. Le précipité est remis en suspension dans quelques cm³ de réactif de lavage. On centrifuge à nouveau. Après 3 centrifugations le sulfate d'ammonium est chassé, ce qu'on vérifie par la réaction à l'iodure d'azote. Chaque précipité est

recueilli quantitativement sur un filtre duri (Durieux, n° 128, étiquette verte) humecté de réactif de lavage. Les précipités sont égouttés et desséchés à la chaleur d'un radiateur. On fait minéraliser le filtre et le précipité en présence du catalyseur de DUMAZERT et MARCELET [5] au sélénite de mercure et au sulfate acide de potassium, et de 3 cm³ d'acide sulfurique pur. Après 2 heures le liquide sulfurique est incolore. L'azote est dosé par microkjeldahl. Pour vérifier que les réactifs ne contiennent pas d'azote on fait un témoin avec un filtre humecté de réactif de lavage. Nous avons terminé le dosage de l'azote selon la microméthode de kjeldahl par un titrage iodométrique de l'acide sulfurique N/70 non saturé par le distillat ammoniacal. Pour cela on déplace l'iode d'un mélange d'iodate et d'iodure de potassium. L'iode en excès est titré par l'hyposulfite de soude N/70 en présence d'empois d'amidon. Cette méthode s'est révélée plus sensible que celle qui utilise le dosage alcalimétrique de l'acide N/70 restant dans le distillat ammoniacal. C'est pourquoi nous l'avons choisie (1).

V. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

On trouvera nos résultats rassemblés dans les tableaux I à XXV, dans lesquels la solubilité S des protéines étudiées est exprimée en grammes d'azote pour 1000 cm³ de solution, log S étant égal à log N p. 1000, la concentration en sel (lignes 1 et 2) étant exprimée en p. 100 de la saturation et en force ionique 1/2 pour 1000 cm³ de solution. Nous avons fait figurer dans ces tableaux les valeurs de S déterminées par photométrie et par microkjeldahl quand ces deux méthodes ont été employées. Dans un certain nombre de cas, seuls les dosages d'azote par voie chimique ont été réalisés.

Les figures 2, 3, 4, 5, 6 faisant suite à ces tableaux sont la traduction graphique des données expérimentales obtenues sur un échantillon de chaque préparation étudiée.

(1) Un procédé de titrage alcalimétrique décrit par M. NICLOUX (Titration finale de l'ammoniaque dans le microdosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 483) peut opportunément être substitué à celui que nous avons mis en œuvre. Sa description étant postérieure au début de nos expériences, nous ne l'avons pas employé pour celles-ci.

TABLEAU I. — *Relargage d'une méthémoglobine de Bœuf par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 4).*

Temps d'équilibration : 14 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Concentration en sel	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{\Gamma}{2}$	5,075	5,250	5,425	5,600	5,687	5,775	5,862	5,950	6,037	6,125	6,212	6,300	6,475	6,650
p. 100 de la saturation .	72,50	75,00	77,50	80,00	81,25	82,50	83,75	85,00	86,25	87,50	88,75	90,00	92,50	95,00
S (g. N p. 1000)...	6,630	0,630	0,630	0,606	0,576	0,446	0,301	0,206	0,128	0,083	0,048	0,028	0,011	0,004
Microkjeldahl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
log S.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU II. — *Relargage d'une carboxyhémoglobine de Bœuf par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 8).*

Temps d'équilibration : 14 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7
Concentration en sel	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{\Gamma}{2}$	4,900	5,425	5,600	5,775	5,950	6,425	6,300
p. 100 de la saturation.....	75,00	77,50	80,00	82,50	85,00	87,50	90,00
S (g. N p. 1000).....	4,235	1,202	0,753	0,470	0,217	0,116	0,051
Microkjeldahl	—	—	—	—	—	—	—
log S.....	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU III. — Relargage de deux méthémoglobines de Chien par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 5).

Temps d'équilibration : 18 h.

CHIEN 1 A.

Numéros des tubes		1	2	3	4
Concentration en sel	1	—	—	—	—
	2	5,775	5,950	6,425	6,300
	p. 100 de la saturation	82,50	85,00	87,50	90,10
S (g. N p. 1000), <i>Microkjeldahl</i>		0,357	0,094	0,022	0,005
log S.....		1,553	2,974	2,343	3,602

CHIEN 1 B.

Numéros des tubes		1	2	3
Concentration en sel	1	—	—	—
	2	5,775	5,950	6,425
	p. 100 de la saturation	82,50	85,00	87,50
S (g. N p. 1000), <i>Microkjeldahl</i>		0,483	0,425	0,028
log S.....		1,685	1,098	2,454

TABLEAU IV. — Relargage d'une carboxyhémoglobine de Chien par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22°. (Ce tableau résume deux expériences concordantes) (N° 7).

Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration en sel	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	4,900	5,425	5,600	5,775	5,950	6,425	6,300	6,475	6,650
	p. 100 de la saturation...	70,00	77,50	80,00	82,50	85,00	87,50	90,00	92,50	95,00
S (g. N p. 1000), <i>Microkjeldahl</i>		0,722	0,722	0,714	0,394	0,479	0,089	0,039	0,014	0,010
log S.....		0,853	1,852	1,853	1,592	1,254	2,950	2,592	2,147	2

TABLEAU V. — *Relargage d'une méthémoglobine de Chien par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 6).*
Temps d'équilibration : 24 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en sel	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\Gamma}{2} \end{array} \right.$	6,90	7,20	7,50	7,80	8,10	8,40	8,70	9,00
	$\left(\begin{array}{l} \text{p. 100 de la saturation} \end{array} \right.$	57,50	60,00	62,50	65,00	67,50	70,00	72,50	75,00
S (g. N p. 1000).....		0,290	0,290	0,283	0,085	0,026	0,008	0,002	0,0006
<i>Microkjeldahl</i>									
log S.				1,453	2,930	2,416	3,904	3,398	

TABLEAU VI. — *Redissolution d'une méthémoglobine de Chien cristallisée dans une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante à pH = 6,50 et à 22° (N° 6).*
Temps d'équilibration : 24 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentration en sel	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\Gamma}{2} \end{array} \right.$	4,20	4,50	4,80	5,10	5,40	5,70	6,00	6,30	6,60	6,90	7,20	7,50
	$\left(\begin{array}{l} \text{p. 100 de la saturation} \end{array} \right.$	35,00	37,50	40,00	42,50	45,00	47,50	50,00	52,50	55,00	57,50	60,00	62,50
S (g. N p. 1000).....		0,297	0,294	0,268	0,214	0,144	0,096	0,062	0,036	0,025	0,013	0,008	0,005
<i>Microkjeldahl</i>													
log S.					1,331	1,16	2,985	2,792	2,564	2,405	2,424	3,903	3,699

TABLEAU VII. — Redissolution d'une méthémoglobine de Chien cristallisée dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 5).
Temps d'équilibration : 17 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$\left. \begin{array}{l} \text{I}^{\cdot} \\ \hline 2 \end{array} \right\} \text{Concentra-}$	4,375	4,550	4,637	4,725	4,812	4,900	4,987	5,075	5,162	5,250	5,337	5,425	5,512	5,600
$\left. \begin{array}{l} \text{p. 100 de la} \\ \text{saturation.} \end{array} \right\}$	62,50	65,00	66,25	67,50	68,75	70,00	71,25	72,50	73,75	75,00	76,25	77,50	78,75	80,00
S (g. N p. 1000)... <i>Microkjeltahl</i>	0,514	0,500	0,478	0,456	0,386	0,310	0,270	0,186	0,120	0,082	0,019	0,046	0,023	0,014
log S.....				1,664	1,587	1,532	1,432	1,270	1,080	2,915	2,690	2,664	2,362	2,058

TABLEAU VIII. — Redissolution d'une carboxyhémoglobine de Chien cristallisée dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 7).
Temps d'équilibration : 14 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\left. \begin{array}{l} \text{I}^{\cdot} \\ \hline 2 \end{array} \right\} \text{Concentra-}$	4,637	4,725	4,812	4,900	4,987	5,075	5,162	5,250	5,337	5,425	5,512	5,600
$\left. \begin{array}{l} \text{p. 100 de la satu-} \\ \text{ration.} \end{array} \right\}$	66,25	67,50	68,75	70,00	71,25	72,50	73,75	75,00	76,25	77,50	78,75	80,00
S (g. N p. 1000) <i>Microkjeldahl</i>	0,170	0,436	0,470	0,418	0,282	0,192	0,150	0,088	0,054	0,048	0,026	0,020
log S.....				1,622	1,466	1,284	1,177	2,945	2,740	2,686	2,417	2,319
S (g. N p. 1000) <i>Photométrie</i>	0,460	0,460	0,460	0,398	0,284	0,196	0,142	0,089	0,061	0,042	0,028	0,020
log S.....				1,663	1,460	1,293	1,153	2,953	2,790	2,628	2,448	2,315

TABLEAU IX. — Redissolution d'une carboxyhémoglobine de Cheval cristallisée dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 1).
Temps d'équilibration : 17 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Concentration en sel	$\frac{\Gamma}{2}$	1,750	1,925	2,100	2,275	2,450	2,625	2,800	2,975	3,150	3,325	3,500	3,675	3,850	4,025	4,200
p. 100 de la saturation.	25,00	27,50	30,00	32,50	35,00	37,50	40,00	42,50	45,00	47,50	50,00	52,50	55,00	57,50	60,00	62,50
S (g. N p. 1000)...	0,820	0,820	0,790	0,702	0,567	0,432	0,303	0,225	0,150	0,102	0,065	0,047	0,025	0,016	0,007	0,003
log S.....				1,847	1,755	1,637	1,482	1,353	1,176	1,011	2,819	2,678	2,409	2,215	3,864	3,557

TABLEAU X. — Relargage d'une carboxyhémoglobine de Cheval par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 2).
Temps d'équilibration : 18 h.

	Numéros des tubes															
	1	2	3	4	5	6	7	8								
Concentration en sel	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\Gamma}{2} \dots\dots\dots \\ p. 100 \text{ de la saturation} \dots\dots\dots \end{array} \right.$															
S (g. N p. 1000).....	1,439	1,341	1,156	0,694	0,381	0,125	0,022	0,004								
log S.....			0,063	1,841	1,582	1,097	2,356	3,620								

TABLEAU XIII. — *Relargage d'une méthémoglobine d'Homme par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 12).*
Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\frac{\Gamma}{2}$	7,20	7,35	7,50	7,65	7,80	7,95	8,10	8,25	8,40	8,55	8,70	8,85
Concentration p. 100 de la saturation	60,00	61,25	62,50	63,75	65,00	66,25	67,50	68,75	70,00	71,25	72,50	73,75
S (g. N p. 1000),..... <i>Microkjeldahl</i>	0,532	0,516	0,412	0,360	0,297	0,228	0,174	0,097	0,056	0,034	0,019	0,009
log S.....	—	1,713	1,615	1,557	1,474	1,359	1,240	2,988	2,750	2,535	2,281	3,956
S (g. N p. 1000),..... <i>photométrie</i>	0,552	0,504	0,422	0,356	0,286	0,214	0,166	0,090	0,054	0,030	0,014	0,07
log S.....	—	1,763	1,626	1,552	1,457	1,331	1,220	2,955	2,733	2,486	2,147	3,845

TABLEAU XIV. — *Relargage d'une carboxyhémoglobine d'Homme par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 9).*
Temps d'équilibration : 17 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$\frac{\Gamma}{2}$	4,900	5,075	5,250	5,337	5,425	5,512	5,600	5,687	5,775	5,862	5,950	6,125	6,300	6,650
Concentration p. 100 de la saturation	70,00	72,50	75,00	76,25	77,50	78,75	80,00	81,25	82,50	83,75	85,00	87,50	90,00	95,00
S (g. N p. 1000),..... <i>Microkjeldahl</i>	0,678	0,664	0,654	0,636	0,500	0,428	0,303	0,224	0,121	0,075	0,046	0,017	0,009	0,005
log S.....	—	1,815	1,802	1,700	1,632	1,482	1,350	1,083	2,876	2,664	2,231	3,846	3,700	3,700

TABLEAU XV. — *Relargage d'une méthémoglobine d'Homme par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 10).*
Temps d'équilibration : 16 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$\left. \begin{array}{l} \Gamma \\ 2 \end{array} \right\}$ Concentration en sel	4,900	5,075	5,250	5,337	5,425	5,512	5,600	5,687	5,775	5,862	5,950	6,125	6,300
$\left. \begin{array}{l} \Gamma \\ 2 \end{array} \right\}$ p. 100 de la saturation	70,00	72,50	75,00	76,25	77,50	78,75	80,00	81,25	82,50	83,75	85,00	87,50	90,00
S (g N p 40'0)..... <i>Microkjeldahl</i>	0,595	0,595	0,582	0,426	0,334	0,286	0,216	0,153	0,101	0,065	0,039	0,015	0,006
log S.....			1,765	1,630	1,525	1,457	1,335	1,185	1,005	0,814	0,591	0,218	0,379
S (g N p 1000)..... <i>Photométrie</i>	0,594	0,594	0,578	0,412	0,306	0,274	0,214	0,150	0,094	0,053	0,032	0,015	
log S.....		1,775	1,762	1,626	1,487	1,438	1,332	1,177	0,974	0,725	0,505	0,217	

TABLEAU XVI. — *Relargage d'une carboxyhémoglobine d'Homme par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 11).*
Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\left. \begin{array}{l} \Gamma \\ 2 \end{array} \right\}$ Concentration en sel	7,20	7,50	7,80	7,95	8,10	8,25	8,40	8,70	8,85
p. 100 de la saturation.....	60,00	62,50	65,00	66,25	67,50	68,75	70,00	72,50	73,75
S (g. N p. 1000)..... <i>Microkjeldahl</i>	0,964	0,934	0,424	0,248	0,130	0,098	0,059	0,015	0,008
log S.....		1,972	1,629	1,395	1,115	0,942	0,772	0,217	0,390

TABLEAU XVII. — Relargage d'une carboxyhémoglobine de Lapin par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 13).
Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en sel $\left\{ \begin{array}{l} \frac{\Gamma}{2} \\ \text{p. 100 de la saturation} \end{array} \right.$	5,42	5,60	5,88	6,02	6,16	6,30	6,44	6,58
	77,50	80,00	84,00	86,00	88,00	90,00	92,00	94,00
S (g. N p. 1000) <i>Microkjeldahl</i>	0,510	0,510	0,490	0,389	0,206	0,094	0,052	0,027
log S			1,690	1,590	1,314	2,975	2,720	2,431

TABLEAU XVIII. — Redissolution d'une carboxyhémoglobine de Lapin cristallisée dans une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 14).
Temps d'équilibration : 16 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en sel $\left\{ \begin{array}{l} \frac{\Gamma}{2} \\ \text{p. 100 de la saturation} \end{array} \right.$	7,20	7,80	8,10	8,40	8,55	8,70	8,85	9,00	9,15	9,30
	60,00	65,00	67,50	70,00	71,25	72,50	73,65	75,00	76,25	77,50
S (g. N p. 1000) <i>Microkjeldahl</i>	0,828	0,826	0,446	0,210	0,138	0,072	0,042	0,027	0,020	0,011
log S	1,000	1,918	1,650	1,323	1,140	2,858	2,629	2,432	2,301	2,042
S (g. N p. 1000) <i>Photomètre</i>	0,804	0,443	0,198	0,130	0,130	0,075	0,040	0,026	0,019	0,011
log S		1,616	1,296	1,144	2,875	2,608	2,444	2,292	2,057	

TABLEAU XIX. — Relargage d'une carboxyhémoglobine de Lapin par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 14).

Temps d'équilibration : 16 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration en sel	$\frac{1}{2}$	8,64	9,24	9,36	9,48	9,60	9,84	10,08	10,32	10,56
	p. 100 de la saturation.....	72,00	77,00	78,00	79,00	80,00	82,00	84,00	86,00	88,00
S (g. N p. 1000).....		0,775	0,730	0,636	0,580	0,333	0,220	0,086	0,041	0,009
<i>Microkj. l. dahl</i>										
log S.....			1,863	1,803	1,763	1,522	1,342	2,934	2,613	3,954

TABLEAU XX. — Redissolution d'une carboxyhémoglobine de Mulet cristallisée dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 3).

Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	12	13	14	15	16	17
Concentration en sel	$\frac{1}{2}$	2,100	2,275	2,362	2,450	2,537	2,625	2,712	2,800	2,887	2,975	3,062	3,150	3,225	3,500	3,587	3,675	3,762
	p. 100 de la saturation	30,00	32,50	33,25	35,00	36,25	37,50	38,75	40,00	41,25	42,50	43,75	45,00	47,50	50,00	51,25	52,50	53,75
S (g. N p. 1000)...		0,628	0,620	0,596	0,560	0,476	0,441	0,328	0,290	0,230	0,190	0,150	0,125	0,081	0,052	0,039	0,028	0,025
<i>Photométrie</i>																		
log S.....							1,613	1,516	1,463	1,362	1,28	1,176	1,097	2,909	2,716	2,588	2,46	2,398

TABEAU' XXI. — *Relargage d'une carboxyhémoglobine de Pore dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique, à pH = 6,50 et à 22° (N° 16).*

Temps d'équilibration : 15 h.

Numéros des tubes		1	2	3	4	5	6	7
Concentration en sel	I'							
	2	5,075	5,425	5,600	5,775	5,950	6,125	6,300
	p. 100 de la saturation	75,00	77,50	80,00	82,50	85,00	87,50	90,00
S (g. N p. 1000).....		0,938	0,938	0,812	0,425	0,200	0,101	0,059
<i>Microkjeldahl</i>								
log S		1,974	1,974	1,910	1,630	1,302	1,008	2,765

TABLÉAU XXII.
Redissolution d'un carboxyhémoglobine de Pore cristallisée dans une solution de sulfate d'ammonium, à pH = 6,50 et à 22° (N° 16). Expériences A et B.
Temps d'équilibration : 39 h. 30.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
$\frac{V}{2}$	6,00	6,30	6,60	6,75	6,90	7,05	7,20	7,35	7,65	7,80	7,95	8,10	8,25	8,40	8,55	8,70
$\left. \begin{array}{l} \text{Concentra-} \\ \text{tion en sel} \end{array} \right\} \text{p. 100 de la saturation}$	50,09	52,50	55,00	56,25	57,50	58,75	$\frac{60,00}{A \dots B}$	61,25	63,75	$\frac{65,00}{A \dots B}$	66,25	$\frac{67,50}{A \dots B}$	68,75	$\frac{70,00}{A \dots B}$	71,25	72,5
S (g. N p 1000).... <i>Microkjeldahl</i>			0,617	0,617	0,575	0,465	0,340 0,358	0,234	0,115	0,080 0,086	0,050	0,030 0,033	0,030	0,014 0,016	0,011	0,011
log S.....							$\frac{1,532}{1,555}$	1,370	1,061	$\frac{2,904}{2,935}$	2,700	$\frac{2,478}{2,519}$	$\frac{2,478}{2,519}$	$\frac{2,165}{2,205}$	$\frac{2,042}{2,042}$	$\frac{2,042}{2,042}$

TABLEAU XXIII. — Redissolution d'une carboxyhémoglobine de Porc cristallisée dans un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique, à pH = 6,50 et à 22° (N° 15).
Temps d'équilibration : 16 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en sel	5,250	5,542	5,600	5,687	5,775	5,862	6,037	6,125	6,212	6,300
p. 100 de la saturation.	75,00	78,75	80,00	81,25	82,50	83,75	86,25	87,50	88,75	90,00
S (g. N p. 1000)..... <i>Microkjeldahl</i>	0,230	0,220	0,486	0,436	0,095	0,070	0,032	0,022	0,019	0,015
log S			1,270	1,434	2,982	2,867	2,503	2,355	2,280	2,185

TABLEAU XXIV. — Relargage d'une hémoglobine de Requin peau bleue par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22° (N° 18).
Temps d'équilibration : 18 h.

Numéros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration en sel	6,00	7,20	7,44	7,80	8,16	8,40	8,64	9,00	9,36
p. 100 de la saturation.....	50,00	60,00	62,00	65,00	68,00	70,00	72,00	75,00	78,00
S (g. N p. 1000)..... <i>Microkjeldahl</i>	1,317	1,287	1,227	1,152	1,144	0,898	0,488	0,276	0,118
log S.				0,062	0,058	1,954	1,688	1,442	1,072

TABLEAU XXV. — Relargage d'une hémoglobine de Tortue de mer par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,12 et à 22° (N° 17).
Temps d'équilibration : 18 h.

Numeros des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentration en sel	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{2}$	0	4,80	5,40	6,00	6,60	6,96	7,20	7,44	7,80	8,40	9,00	9,60
p. 100 de la saturation	0	40,00	45,00	50,00	55,00	58,00	60,00	62,00	65,00	70,00	75,00	80,00
Sig. N p 1000).....	1,010	1,010	1,010	1,010	1,010	0,858	0,826	0,595	0,262	0,444	0,033	0,017
Microkjeldahl						—	—	—	—	—	—	—
log S.....					0,04	1,934	1,917	1,774	1,448	1,044	2,516	2,233

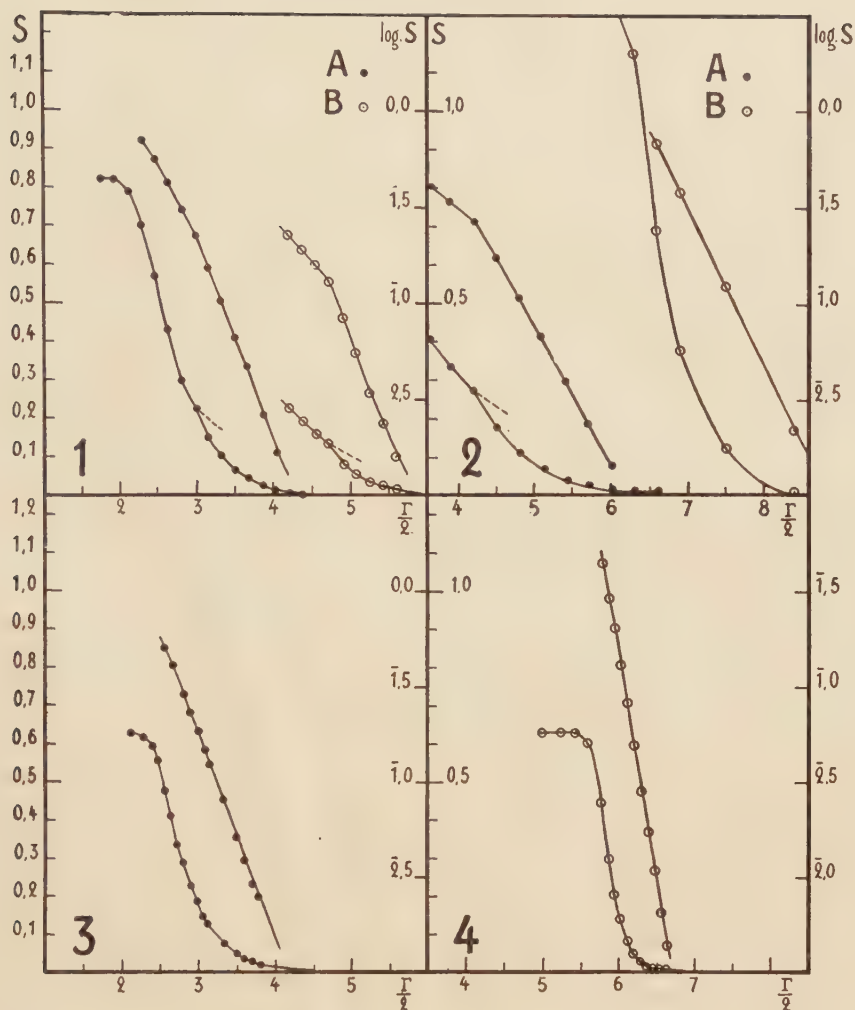


FIGURE 2. — Variations de la solubilité S (courbes) de carboxyhémoglobines pures de Cheval (1, 2) et de Mulet (3) et de méthémoglobine pure de Bœuf (4) et variations de $\log S$ (droites) en fonction de la concentration du milieu en sel neutre (2, sulfate d'ammonium ; 1, 3 et 4 : mélange équimoléculaire de phosphate mono et dipotassique) aux pH et T° c indiqués au tableau XXVI : A = dissolution de cristaux ; B = relargage.

Abcisses : concentration en sel neutre exprimée en force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : à gauche, S (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution) à droite, $\log S$.

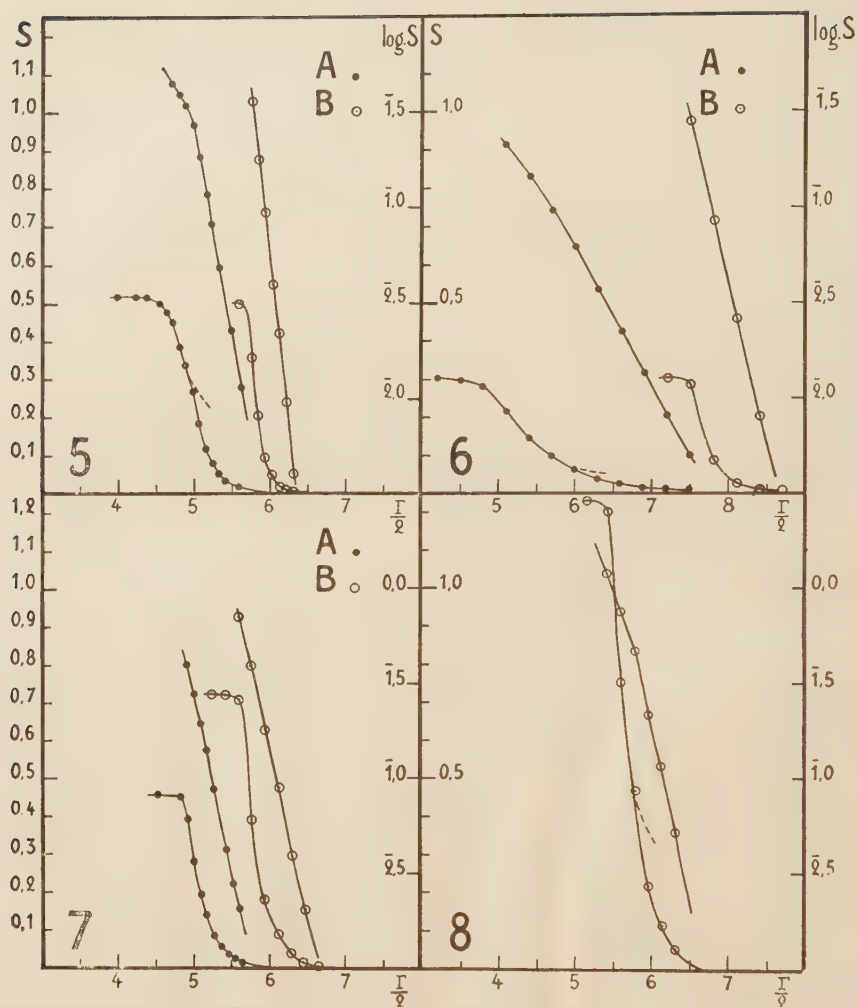


FIGURE 3. — Variations de la solubilité S (courbes) de carboxyhémoglobines pures de Chien (7) et de Bœuf (8) et de méthémoglobines pures de Chien (5 et 6) et variations de $\log S$ (droites) en fonction de la concentration du milieu en sel neutre (5, 7 et 8 : mélange équimoléculaire de phosphate mono- et dipotassique ; 6 : sulfate d'ammonium) aux pH et T° indiqués au tableau XXVI. A = dissolution de cristaux ; B = relargage.

Abcisses : concentration en sel neutre exprimée en force ionique, $I/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : à gauche S (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution) ; à droite $\log S$.

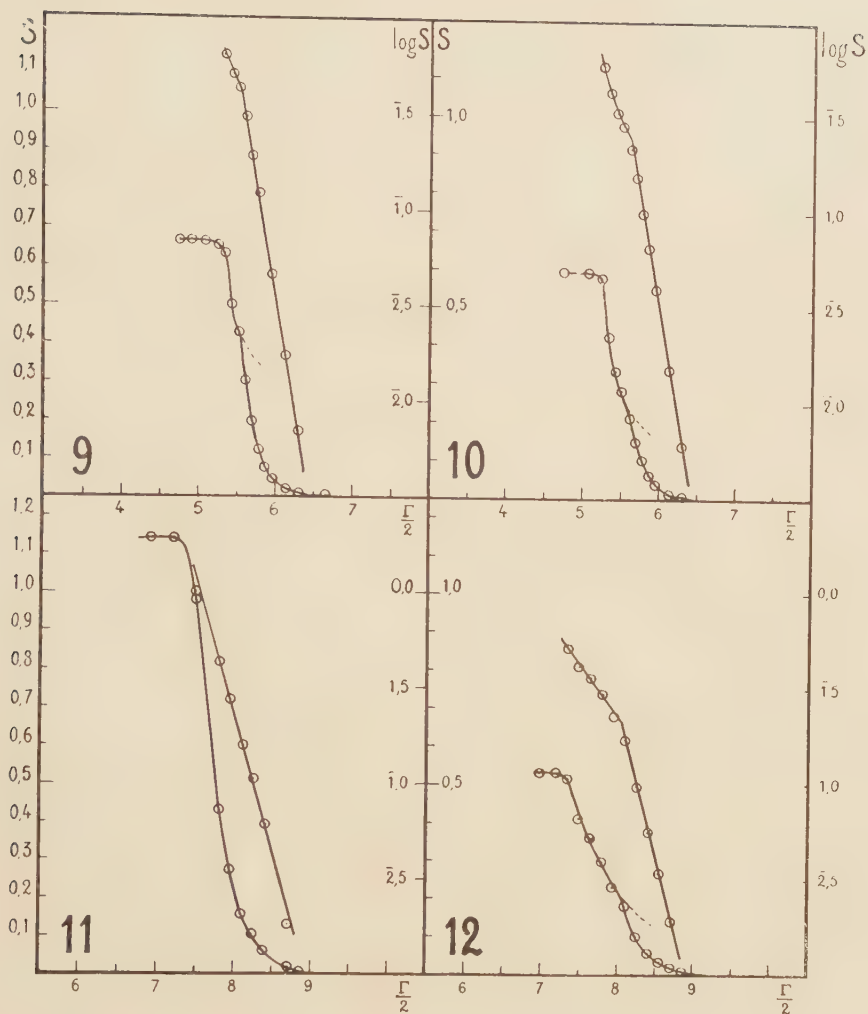


FIGURE 4. — Variations de la solubilité S (courbes) de carboxyhémoglobines (9 et 11) et de méthémoglobines pures (10 et 12) d'Homme et variations de $\log S$ (droites) en fonction de la concentration du milieu en sel neutre (9 et 10 : mélange équimoléculaire en phosphates mono et dipotassique ; 11 et 12 : sulfate d'ammonium) aux pH et T° indiqués au tableau XXVI (Relargage).

Abcisses : concentration en sel neutre exprimée en force ionique, $\frac{\Gamma}{2}$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : à gauche, S (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution) ; à droite, $\log S$.

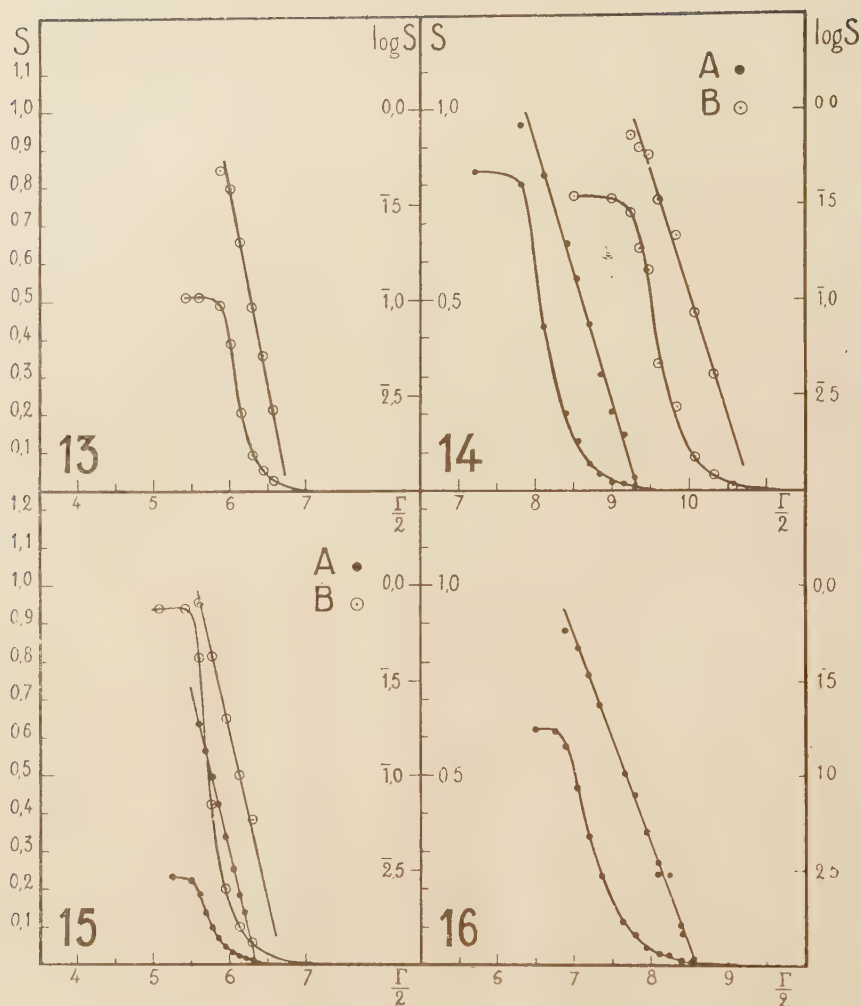


FIGURE 5. — Variations de la solubilité S (courbes) de carboxyhémoglobines pures de Lapin (13 et 14) et de Porc (15 et 16) et variations de $\log S$ (droites) en fonction de la concentration du milieu en sel neutre (13 et 15 : mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique ; 14 et 16 : sulfate d'ammonium) aux pH et T° indiqués au tableau XXVI. A = dissolution de cristaux ; B = relargage.

Abscisses : concentration en sel neutre exprimée en force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : à gauche, S (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution) ; à droite, $\log S$.

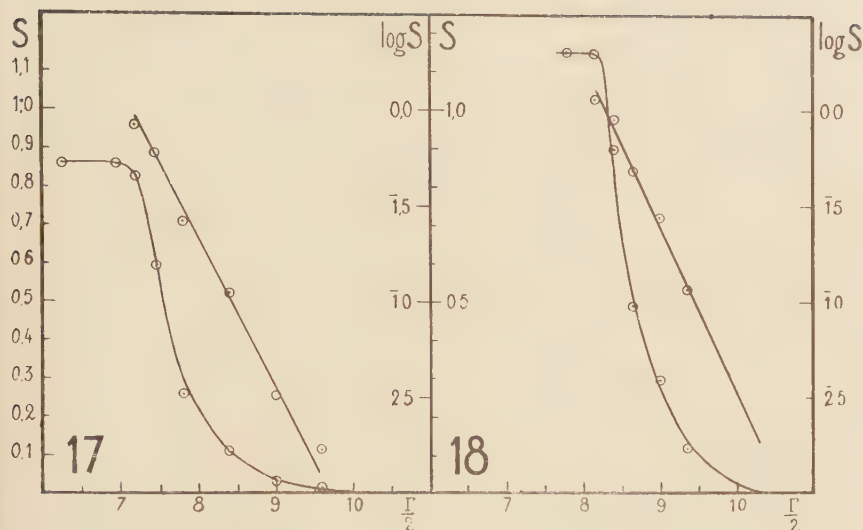


FIGURE 6. — Variations de la solubilité S (courbes) des carboxyhémoglobines pures de Tortue de mer (17) et de Requin peau bleue (18) et variations de $\log S$ (droites) en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium aux pH et T^c indiqués au tableau XXVI (relargage).

Abcisses : concentration en sel neutre exprimée en force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm³ de solution ; Ordonnées : à gauche, S (g. N protéique p. 1000 cm³ de solution) ; à droite, $\log S$.

Examen d'ensemble des résultats expérimentaux.

Nous avons réuni les droites traduisant les variations de $\log S$ en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ dans les figures 7, 8 et 9 ci-dessous et dans le tableau XXVI les valeurs de β' et de K_s' de l'équation de COHN calculées à partir de ces droites afin de faciliter la discussion de nos résultats.

Un petit nombre de faits ressort de l'examen de ces documents. Les premiers sont relatifs aux caractères de la solubilité d'un même pigment dans différentes conditions, les autres au comportement des diverses hémoglobines sanguines dans des milieux de concentration croissante en sels neutres.

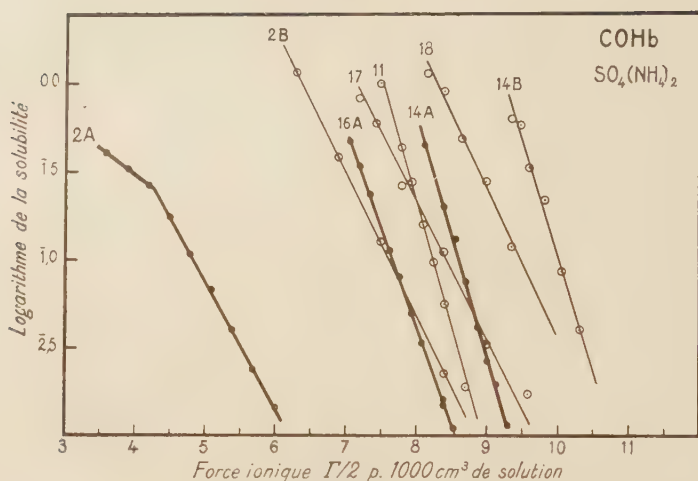


FIGURE 7. — Variations du logarithme de la solubilité (A = dissolution ; B ou pas d'indication particulière = relargage) de carboxyhémoglobines pures de Cheval (2 A et B), d'Homme (11), de Lapin (14 A et B), de Porc (16), de Requin peau bleue (18) et de Tortue de mer (17) en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium aux pH et T°c indiqués dans le tableau XXVI.

Abscisses : concentration en sel exprimée en force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : logarithme de la solubilité (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution).

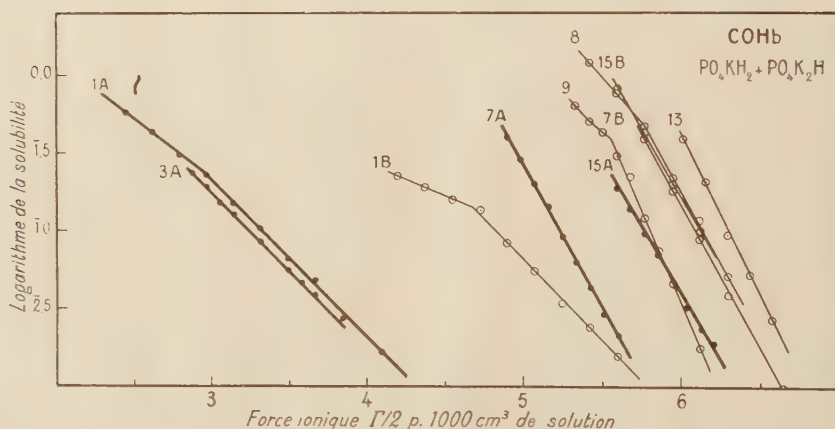


FIGURE 8. — Variations du logarithme de la solubilité (A = dissolution de cristaux ; B ou pas d'indication particulière = relargage) de carboxyhémoglobines pures de Bœuf (8), de Cheval (1 A et B), de Chien (7 A et B), de Lapin (13), de Mulet (3 A), de Porc (15 A et B) en fonction de la concentration du milieu en mélange équimoléculaire de phosphate mono et dipotassique, aux pH et T°c indiqués dans le tableau XXVI.

Abscisses : concentration en sel exprimée en force ionique, $\Gamma/2$, p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : logarithme de la solubilité (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution).

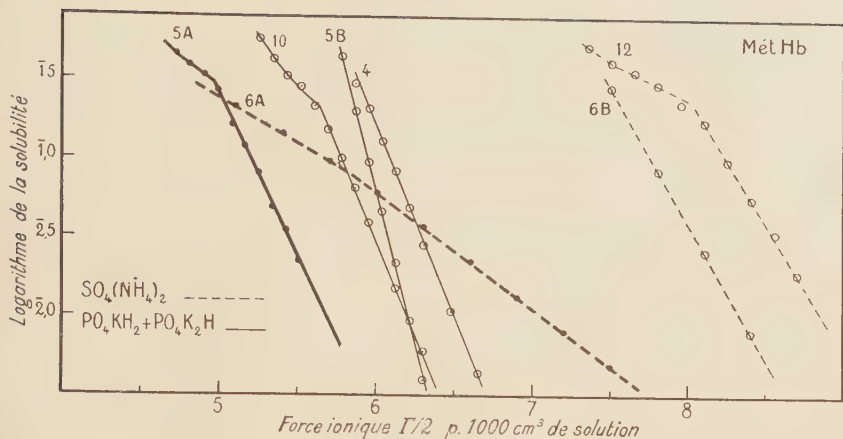


FIGURE 9. — Variations du logarithme de la solubilité (A = dissolution de cristaux ; B ou pas d'indication particulière = relargage) de méthémoglobines pures de Bœuf (4), de Chien (5 A et B, 6 A et B) et d'Homme (10 et 12) en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium (6 A et B, 12) ou en mélange équimoléculaire de phosphate mono et dipotassique (4, 5 A et B, 10) aux pH et T°c indiqués dans le tableau XXVI.

Abscisses : concentration en sel exprimée en force ionique, $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 de solution. Ordonnées : logarithme de la solubilité (g. N protéique p. 1000 cm^3 de solution).

Une hémoglobine cristallisée a toujours une solubilité inférieure à celle du même corps considéré à l'état amorphe (relargage). Les variations de $\log S$ en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ présentent dans l'un et l'autre cas un parallélisme rigoureux, sauf pour la méthémoglobine de chien, mais à des valeurs de $\frac{\Gamma}{2}$ différentes. Il en résulte que la valeur de K_s' est la même pour la dissolution du corps cristallisé et pour son relargage tandis que celle de β' est toujours plus grande lors du second.

Comme l'avaient remarqué COHN, SÖRENSEN, GREEN, la valeur de K_s' dépend de la protéine et du sel neutre mis en œuvre. Elle est plus élevée dans les milieux contenant des phosphates de potassium que dans ceux riches en sulfate d'ammonium ; la précipitation des pigments hémoglobiques et leur solubilisation complètes s'opèrent entre des limites de concentration en sels beaucoup plus étroites en présence des premiers. Par ailleurs, les deux constantes de l'équation de COHN diffèrent pour une carboxyhémoglobine et pour la méthémoglobine qui en dérive. Enfin l'examen des figures 2 à 9 montre que tous les corps étudiés ne se comportent pas comme des produits

homogènes. Certaines hémoglobines présentent les caractères de solubilité d'un mélange de deux protéines car les variations de $\log S$ en fonction de $\frac{1}{2}$ s'ordonnent suivant deux segments de droite bien individualisés.

TABLEAU XXVI. — Constantes K_s' et β' de l'équation de COHN pour les carboxyhémoglobines et les méthémoglobines sanguines de diverses espèces animales en présence de sulfate d'ammonium ou de phosphates de potassium aux pH et aux températures indiquées ci-dessous.

Esèce animale et n° des courbes	Relargage (R) ou dissolution de cristaux (%)	β'	K_s'	pH	T°c	
SULFATE D'AMMONIUM.						
CO Hb	Cheval 2 A	C	2,42	0,71	6,60	22°0
	Cheval 2 B	R	3,34	0,70	6,30	22°0
	Homme 11	R	11,85	1,56	6,55	22°0
	Lapin 14 A	C	10,50	1,34	6,60	22°0
	Lapin 14 B	R	12,51	1,34	6,80	13°5
	Porc 16	C	7,65	1,12	6,50	22°0
	Requin 18	R	7,33	0,88	6,80	25°0
	Tortue 17	R	5,72	0,80	6,77	22°0
Mét Hb	Chien 6 A	C	3,17	0,73	6,60	22°0
	Chien 6 B	R	12,35	1,72	6,60	22°0
	Homme 12	R	11,94	1,57	6,55	22°0
PHOSPHATES MONO- ET DIPOTASSIQUE.						
CO Hb	Bœuf 8	R	10,18	1,82	6,50	37°0
	Cheval 1 A	C	2,37	1,01	6,55	22°0
	Cheval 1 B	R	4,02	1,04	6,55	22°0
	Chien 7 A	C	8,59	1,83	6,50	22°0
	Chien 7 B	R	10,09	1,82	6,54	21°0
	Homme 9	R	12,54	2,33	6,50	22°0
	Lapin 13	R	12,25	2,10	6,50	22°0
	Mulet 3	C	2,28	1,02	6,50	22°0
	Porc 15 A	C	9,19	1,77	6,50	22°0
	Porc 15 B	R	9,96	1,79	6,50	22°0
Mét Hb	Bœuf 4	R	13,51	2,38	6,50	22°0
	Chien 5 A	C	9,60	2,04	6,50	22°0
	Chien 5 B	R	20,00	3,54	6,58	22°0
	Homme 10	R	12,46	2,33	6,49	22°0

La comparaison des résultats obtenus sur les hémoglobines des divers animaux révèle des différences ou des analogies entre certains de ces pigments. Si on excepte les hémoglobines de Cheval et de Mulet, de Bœuf et de Porc qui se comportent respectivement de manière à peu près identique, toutes les autres présentent des valeurs de K_s' et de β' particulières à l'espèce animale dont elles proviennent. Il semble néanmoins

qu'il existe plusieurs groupes d'hémoglobines dont les valeurs de K_s' sont très voisines et celle de β' assez différentes ; aussi avons-nous d'abord pu croire à tort que la solubilité des pigments hémoglobiniques en présence de sulfate d'ammonium est caractérisée par $K_s' = 0,80 \pm 0,10$.

VI. — DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Un petit nombre de points ressortant de l'examen d'ensemble de nos résultats qui vient d'être fait mérite d'être discuté, afin que nous puissions formuler pour chacun d'eux des conclusions précises. Ce sont :

la solubilité comparée des protéines cristallisées et des protéines amorphes (relargage),

la valeur relative des constantes β' et K_s' de l'équation de COHN pour caractériser les protéines,

les caractères spécifiques de la solubilité des diverses hémoglobines, et enfin

l'existence probable de plusieurs pigments de ce type dans le sang de certains animaux.

1. — *Dissolution des cristaux et relargage.* — Dans tous les cas observés les protéines cristallisées sont relativement beaucoup moins solubles dans des milieux de concentration croissante en un même sel neutre que les protéines amorphes. En effet, nous avons toujours observé que les cristaux des diverses hémoglobines sont extrêmement peu solubles aux concentrations en sel où les mêmes corps dissous commencent seulement à présenter le phénomène du relargage. Comme, dans les deux cas, les valeurs que nous avons déterminées correspondent à un équilibre entre les corps dissous et le précipité ou les cristaux de la même hémoglobine pure, on doit admettre que l'un et l'autre ne présentent pas une solubilité identique dans un même milieu. Or, la solubilité dans des conditions expérimentales déterminées est une constante physique permettant de caractériser un corps pur. Il faut donc admettre que les hémoglobines amorphes (relargage) et les hémoglobines cristallisées n'existent pas sous un même état. Une hypothèse récemment formulée par DUCLAUX (1)

(1) Communication faite le 24 avril 1941 à la Société de Chimie biologique, actuellement sous presse.

et selon laquelle les protéines cristallisées seraient non pas des corps purs se présentant avec une symétrie cristalline, reflétant leur structure moléculaire, mais des coacervats, apporterait, si elle était vérifiée, une explication du fait singulier que nous avons observé. Celui-ci n'est d'ailleurs pas la première « anomalie de solubilité » des cristaux protéiques puisque, comme l'ont montré SÖRENSEN, STEINHARDT, la solubilité de ceux-ci est, dans certaines conditions, fonction des rapports entre les quantités de corps de fond et de solvant mises en œuvre.

2. — *Valeur relative des constantes β' et K_s' pour la caractérisation des protéines.* Comme nous l'avons signalé, l'ensemble des travaux antérieurs permet de considérer la valeur de K_s' comme caractéristique d'une protéine en présence d'un sel neutre déterminé, indépendamment du pH et de la température. Nos résultats confirment cette opinion, car, dans tous les cas étudiés, les valeurs de K_s' diffèrent suivant que nous avons opéré en présence de sulfate d'ammonium ou de mélanges équimoléculaires de phosphates mono- et dipotassique. Comme par ailleurs les diverses préparations d'hémoglobine provenant de sujets d'une même espèce nous ont toujours permis d'obtenir la même valeur de K_s' en présence d'un même sel, nous considérons l'établissement de cette constante comme un moyen simple, précis et fidèle de caractériser une protéine.

L'intérêt de la valeur de β' est à cet égard beaucoup moins grand, sans être pour cela négligeable. Les travaux antérieurs avaient déjà établi qu'elle varie non seulement avec le sel neutre mis en œuvre, mais avec la température et le pH des milieux. Nous avons confirmé ce fait. Mais il y a plus encore ; nous avons observé que la valeur de β' est variable avec la concentration en protéine des milieux étudiés, ce qui nous paraît dû au phénomène désigné par SÖRENSEN sous le nom de tendance à la dissociation des protéines. Ce phénomène se traduit en effet par l'inégalité de solubilité d'une protéine dans un milieu défini lorsque des quantités variables de corps de fond sont mises en présence d'un même volume de solvant, phénomène dont l'existence a été contrôlée par de nombreux auteurs, mais dont la véritable cause demeure inconnue.

Par ailleurs, la valeur de β' est obtenue par *extrapolation*,

elle ne représente donc que *théoriquement* la solubilité du corps étudié en milieu aqueux pur ($\frac{1}{2} = 0$) et la détermination *directe* de cette dernière donne toujours des résultats fort différents. Dans le cas particulier des hémoglobines, les solubilités des produits cristallisés déterminées expérimentalement par HEIDELBERGER et LANDSTEINER [9] sont très éloignées des valeurs de β' déterminées par GREEN [7], GREEN, COHN et BLANCHARD [8], SÖRENSEN et nous mêmes. C'est dire qu'il ne faut peut être pas attacher à la détermination de la valeur de β' le même intérêt qu'à celle de K_s' pour caractériser une protéine. Néanmoins lorsque deux de ces corps étudiés dans des conditions rigoureusement identiques de pH et de température et dans un milieu renfermant un même sel neutre présentent des valeurs très différentes de β' , il est hors de doute que celles-ci traduisent une différence de leurs caractères de solubilité. Cette différence n'aurait pas une très grande signification si l'on désirait caractériser spécifiquement deux protéines n'appartenant pas au même groupe de corps, comme une sérumalbumine et une sérumglobuline, mais elle est significative lorsqu'on l'observe dans le cas des protéines du même type, comme deux sérumalbumines ou deux hémoglobines. Aussi considérons-nous que sa détermination méritait d'être faite sur les secondes. Il convient maintenant de discuter les résultats de celle-ci.

3. *Solubilité en présence de sels neutres et spécificité des hémoglobines sanguines.* — La diversité des hémoglobines dans le sang d'animaux d'espèces différentes est aujourd'hui bien établie par un ensemble de données résumées dans l'introduction de notre travail. Elle tient à la composition et à la structure des diverses globines à l'étude desquelles J. ROCHE s'est particulièrement attaché [12]. Les résultats de notre travail apportent une nouvelle contribution à sa mise en évidence, qu'illustrent les figures 7, 8 et 9 et les données rassemblées dans le tableau XXVI.

Nous avons déjà signalé que les valeurs de K_s' sont toujours identiques, à de très minimes écarts près, pour l'hémoglobine d'une même espèce si l'on considère une préparation de pigment homogène ou la fraction la plus soluble d'un mélange de deux pigments (voir plus bas) en présence d'un même sel neutre. Elles sont relativement voisines dans le cas d'un petit

nombre d'hémoglobines telles que celles du Cheval, du Requin peau bleue, de la Tortue de mer. Par contre elles s'écartent très notablement si on passe de ces espèces à d'autres telles que l'Homme, le Chien, le Lapin, le Porc. Contrairement à notre attente, la transformation de la carboxyhémoglobine en méthémoglobine est susceptible de les modifier. Il est donc certain que l'état (ferreux dans la carboxyhémoglobine, ferrique dans la méthémoglobine) du groupement prosthétique de ces pigments est susceptible de modifier leur solubilité, ce qui tient sans doute à une relation entre leurs groupes polaires et l'état du fer dans leur groupement prosthétique. Les recherches d'HAUROWITZ montrant que les diesters de l'hématine se combinent aussi bien aux globines que l'hématine libre pour régénérer le chromoprotéide tendent à démontrer que les deux groupements carboxyle du groupement prosthétique sont libres dans la molécule d'hémoglobine. Peut-être est-ce leur action qui se manifeste dans les différences de solubilité que nous venons de signaler.

Quant aux valeurs de β' déterminées dans des conditions de pH et de température identiques, elles présentent d'un pigment à l'autre des différences traduisant la spécificité des diverses hémoglobines étudiées, comme en rend compte l'examen du tableau XXVI.

Les constantes de la relation de COHN nous permettent donc de caractériser spécifiquement les diverses hémoglobines sanguines avec une précision et une rigueur bien supérieures à celles des autres méthodes mises en œuvre jusqu'ici dans le même but (mesure de la position des bandes d'absorption, de la vitesse de transformation en cathémoglobine, de l'affinité pour l'oxygène, etc...) Les caractères de solubilité en milieu salin ne suffisent pas toujours pour identifier un de ces pigments puisque, comme nous l'avons vu, certains d'entre eux (Cheval et Mulet, Bœuf et Porc) sont à cet égard très voisins. Mais ils constituent très souvent un indice de spécificité des plus nets. Des faits du même ordre ont été signalés par J. ROCHE et Y. DERRIEN dans le cas de pigments respiratoires d'un autre groupe, les hémocyanines [14]. Nous avons en effet déjà indiqué les valeurs de K_s' qui permettraient de distinguer nettement les hémocyanines des Mollusques de celles des Crustacés, le pigment de chaque espèce présentant dans les mêmes conditions d'étude une constante β' de valeur ca-

ractéristique. Dans le cas où, comme le montre l'examen des figures 2, 3, 4, 5 et 6, l'allure des courbes de solubilité traduit l'existence de deux fractions dans la préparation d'hémoglobine étudiée, les déterminations de K_s' et de β' n'ont été faites que sur la fraction la plus soluble. En effet un ensemble de recherches poursuivies actuellement au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille a permis d'établir que lorsque plusieurs protéines sont présentes dans un mélange, la relation de COHN ne peut-être appliquée qu'à celle dont la solubilité est la plus grande. Celle qui précipite aux concentrations les moins élevées en sel neutre ne devient en effet rigoureusement insoluble que dans une zone de salinité où l'autre n'est que partiellement dissoute. Il en résulte des phénomènes d'adsorption qui seront particulièrement étudiés dans la thèse de J. AUTRAN. Avant que l'étude de ceux-ci ne soit achevée nous avons estimé qu'il serait injustifié de tirer des conclusions fermes de données pouvant être établies en appliquant la relation de COHN à deux fractions d'hémoglobine pouvant coexister dans une même préparation et nous nous bornerons à examiner les données calculées uniquement pour la plus soluble de celles-ci.

4. *Existence probable de plusieurs hémoglobines dans un même sang.* — GEIGER (1931) puis BRINKMANN, WILDSCHLUT et WATERMANN (1934) et enfin HAUROWITZ (1935) se sont efforcés de mettre en évidence l'existence de deux hémoglobines dans le sang humain, les premiers en séparant ces pigments par électrophorèse, le dernier en démontrant l'inégalité de leur résistance à l'action des bases (réaction de von KRÜGER). Toutefois les conclusions de GEIGER, de BRINKMANN, WILDSCHLUT et WATERMANN n'ont pas emporté la conviction et celles d'HAUROWITZ ne sont basées que sur des arguments indirects. Une certitude absolue ne saurait être acquise à cet égard que par la séparation des hémoglobines pouvant être présentes dans les hématies d'un même animal. Certains résultats de notre travail permettent d'espérer la réalisation de cette séparation par précipitation fractionnée, si l'interprétation suivante que nous proposons est correcte.

La carboxyhémoglobine sanguine de nombreux Mammifères, entre autres le Cheval (1,2), l'Homme (9,11), le Lapin (13,14), obtenue à l'état cristallisée ou purifiée par relargage

présente des variations de $\log S$ en fonctions de $\frac{\Gamma}{2}$ constituant deux droites formant entre elles un angle obtus largement ouvert (voir figures 7 et 8) ce qui traduit l'existence dans leurs préparations de deux fractions protéiques distinctes. Dans d'autres cas (Chien 5, 6 et 7) le pigment à l'état de carboxyhémoglobine est soluble en présence de sels neutres comme un corps pur homogène, ainsi que l'indiquent les variations de $\log S$ en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ (voir figures 7, 8, 9). L'interprétation la plus plausible de ces faits est que *le sang de nombreux Mammifères renferme une hémoglobine sous deux états ou deux hémoglobines*. Comme les molécules du pigment ont toutes la même taille chez ces animaux (protéine monodispersée) SVEDBERG, *il est plus probable que les différences observées tiennent à la présence de deux hémoglobines*.

Il convient de remarquer que si le sang de Cheval contient régulièrement deux fractions hémoglobiniques il n'en est pas toujours de même chez les autres Mammifères étudiés. Les hématies de l'Homme, du Chien, du Lapin, du Porc, entre autres, n'en renferment qu'une, dans des cas plus ou moins nombreux. Comme nous l'avons déjà fait remarquer, cette dernière présente alors des valeurs de K_s' et de β' identiques à celles des constantes caractérisant la plus soluble des fractions hémoglobiniques coexistant dans le sang d'autres animaux de même espèce.

RÉSUMÉ.

L'étude de la dissolution des hémoglobines sanguines cristallisées de neuf espèces de Vertébrés (Bœuf, Cheval, Chien, Homme, Lapin, Mulet, Porc, Requin peau bleue, Tortue de mer) et celle de leur relargage, en présence de sels neutres (sulfate d'ammonium et mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique), à pH et à température fixes a permis d'établir les faits suivants, basés sur la détermination des constantes K_s' et β' de l'équation de E. J. COHN.

1. *Il est possible de caractériser une hémoglobine (HbCO, MétHb) par la valeur des constantes K_s' et β' de l'équation de COHN en appliquant celle-ci aux données fournies par l'étude de son relargage aussi bien que par celle de la dissolution du produit cristallisé.* Ces valeurs diffèrent suivant la nature du sel neutre mis en œuvre et suivant l'état ferreux (HbCO) ou ferrique (MétHb) du pigment.

2. *La plupart des hémoglobines étudiées (HbCO) présentent des caractères de solubilité traduisant leur spécificité. Dans des conditions expérimentales identiques les valeurs de K_s et de β' relatives à ces corps sont particulières à chacun d'eux, à l'exception d'une part du Cheval et du Mulet, d'autre part du Porc et du Bœuf.*

3. *Les hématies du Cheval contiennent toujours et celles des autres Mammifères la plupart du temps deux fractions hémoglobiniques distinctes par leur solubilité en présence de sels neutres, ce qui traduit alors très probablement l'existence de deux hémoglobines dans le sang des animaux.*

Vu et approuvé :
Marseille, le 2 mai 1941.

JEAN ROCHE.

Vu et approuvé :
Pour le Doyen : *l'Assesseur*,
FERNAND MERCIER.

Vu et permis d'imprimer :
Aix, le 3 mai 1941.
Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

Afin de ne pas surcharger cet index bibliographique et de n'y faire figurer que des indications en relation directe avec notre travail expérimental, nous n'y avons pas fait figurer de référence de mémoires consacrés à la structure et aux propriétés des hémoglobines autres que leur solubilité. On trouvera une bibliographie étendue de l'ensemble des travaux auxquels nous avons fait appel en dehors de ceux que nous citons, dans la thèse de Doctorat ès Sciences de Monsieur le Professeur J. ROCHE [13].

1. BERTIN-SANS (H.) et MOITESSIER (J.). — Nouveau procédé pour obtenir de l'hémoglobine à l'aide d'oxyhématine et d'une matière albuminoïde. *Bull. Soc. Chim.*, 1893, **9**, 243-244.
2. BONOT (A.). — Contribution à l'étude de la constitution des protéïdes. *Thèse Doct. Sc., Paris*, 1934, 63 p., Presses Univ., édit., Paris.
3. BUTLER (A. M.) and MONTGOMERY (H.). — The solubility of the plasma proteins. I. Dependence on salt and plasma concentration in concentrated solutions of potassium phosphate. *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, 173-195.
4. COHN (E. J.). — The physical chemistry of proteins. *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349-437.
5. DUMAZERT (C.) et MARCELET (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 201-216.
6. FLORKIN (M.). — Studies in the physical chemistry of the proteins. VII. The solubility of fibrinogen in concentrated salt solutions. *Journ. of biol. Chem.*, 1930, **87**, 629-649.
7. GREEN (A. A.). — Studies in the physical chemistry of the proteins. VIII. The solubility of hemoglobin in concentrated salt solutions. A study of the Salting out of proteins. *Journ. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 495.
8. GREEN (A. A.), COHN (E. J.) and BLANCHARD (M. H.). — Studies in the physical chemistry of proteins. XII. The solubility of human hemoglobin in concentrated salt solutions. *Journ. of biol. Chem.*, 1935, **109**, 631-634.
9. HEIDELBERGER (M.) and LANDSTEINER (K.). — Differentiation of oxyhaemoglobin by means of mutual solubility tests. *Journ. Gen. Physiol.*, 1924, **6**, 131-135.
10. MARQUET (F.). — Recherches sur le poids moléculaire de la sérumbumine et sur le vieillissement du sérum. *Thèse Doct. Pharm., Marseille*, 1935, 118 p., G. Patissier édit., Trévoux.
11. MORGAN (V. E.). — The solubility of myoglobin in concentrated ammonium sulfate solutions. *Journ. of biol. Chem.*, 1935, **112**, 557-563.

12. ROCHE (J.). — Recherches sur les globines. II. Sur le rôle des hématines et des globines dans la spécificité des pigments hématiniques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 110-130.
13. ROCHE (J.). — Essai sur la biochimie générale et comparée des pigments respiratoires. *Thèse Doct. Sc.*, Lyon, 1936, 1 vol., 174 p. Masson et Cie édit., Paris.
14. ROCHE (J.) et DERRIEN (Y.). — Recherches sur les propriétés physico-chimiques des hémocyanines. V. Solubilité en présence de sels neutres, état de dispersion et spécificité des hémocyanines de divers animaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 7-18.
15. ROCHE (J.) et DERRIEN (Y.). — La solubilité de l'hémérythrine du Siponcle en présence de sels netres. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 384.
16. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et CHOUAÏECH (M. S.). — Sur les protéines sanguines de quelques Vertébrés marins (protéines sériques et pigments hémoglobiniques). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, p. 1301.
17. ROCHE (A.), DORIER (M.) et SAMUEL (L.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium. *L'Homme normal. C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1019.
18. ROCHE (J.) et JEAN (G.). — La composition en acides aminés et la spécificité des hémoglobines et des pigments voisins. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1304.
19. ROCHE (A.) et MARQUET (F.). — Microdosage de l'azote protéique en présence de sels ammoniacaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 1630-1632.
20. ROCHE (J.), OLMER (J.) et SAMUEL (L.). — Protéines des transsudats (liquides d'ascite) et protéines du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, n° 11, 1624-1278.
21. ROCHE (J.), ROCHE (A.), ADAIR (G. S.) and ADAIR (M. E.). — The osmotic pressure of globine. *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 1811-1828.
22. ROCHE (A.), SAMUEL (L.) et ARTAUD (R.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium. Signification des fractionnements à diverses concentrations en sel. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1061.
23. ROCHE (J.) et VIEIL (H.). — Préparation et poids moléculaire de la myoglobine de Cheval cristallisée. *C. R. Acad. Sc.*, 1940, **210**, 314-316.
24. SAMUEL (L.). — Recherches sur la biochimie des protéines du sérum et sur la signification du rapport albumine/globuline. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1939, 124 p., M. Declume édit., Lons-le-Saunier.
25. STEINHARDT (J.). — Solubility anomalies of cristalline proteins. *Cold Spring Harbour Symposia on quantitative biology*, 1938, **6**, 1 vol., 395 p., pp. 301-317.

